



# Facteurs génétiques impliqués dans la différenciation de l'endoderme primitif au cours du développement préimplantatoire chez la souris

Nina Wustrack

## ► To cite this version:

Nina Wustrack. Facteurs génétiques impliqués dans la différenciation de l'endoderme primitif au cours du développement préimplantatoire chez la souris. Génétique animale. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2010. Français. NNT : 2010CLF1MM27 . tel-00719625

**HAL Id: tel-00719625**

**<https://theses.hal.science/tel-00719625>**

Submitted on 20 Jul 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Blaise Pascal

Université d'Auvergne  
N° d'ordre

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

## **Thèse**

Présenté à l'Université d'Auvergne  
Pour l'obtention de grade de Docteur d'Université par

**Nina Wustrack**

Spécialité  
Biologie du Développement

# **FACTEURS GENETIQUES IMPLIQUES DANS LA DIFFERENCIATION DE L'ENDODERME PRIMITIF AU COURS DU DEVELOPPEMENT PREIMPLANTATOIRE CHEZ LA SOURIS**

Soutenue publiquement le 04 juin 2010, devant le jury composé de :

**Vincent SAPIN      Président du Jury**

**Florence CAMMAS    Rapportrice**

**Silvia CEREHINI      Rapportrice**

**Jérôme COLLIGNON   Rapporteur**

**Claire CHAZAUD      Directrice de thèse**

Laboratoire Génétique, Reproduction et Développement (GReD)  
UMR/CNRS 6247, Clermont Université, INSERM U931



*Celui qui combat peut perdre, mais celui qui ne combat pas a déjà perdu.*  
*Berthold Brecht*

*Sans curiosité on meurt et sans courage on ne vit pas.*  
*Hugo Pratt*



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous mes rapporteurs Florence Cammas, Silvia Cereghini et Jérôme Collignon et Vincent Sapin d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je suis reconnaissante à J.L. Couderc de m'avoir accueilli au sein de l'unité qui est devenu le GReD sous la direction de C. Vaury au cours de mes trois années à Clermont-Ferrand. Quelle aventure ! Un grand merci va tout naturellement à Claire Chazaud qui m'as pris sous son aile et m'as permis de réaliser ma thèse dans son équipe.

En arrivant dans une nouvelle région, une nouvelle ville et un nouveau labo, bref une nouvelle vie, je ne connaissait personne. Maintenant que je pars, vous allez être nombreux à me manquer ! Je remercie tout le monde de notre laboratoire et des laboratoires voisins pour leur accueil chaleureux !

Un merci à mes collègues présents et passés dont les conversations plus ou moins ( ! ) sérieuses, les rires, les sorties et le soutien m'ont accompagné tout le long ! François (ah, on a fini par cruellement manquer de Patrick Sébastien sans toi !!!!!), Merci à Corinne, pour son écoute, son soutien moral et technique et son humour!!!

Un grand merci à Annie pour son écoute à tout sujet ☐ Merci à Annie, Laurence, Françoise, Aghostina, Sandrine, ☐ pour les mots gentils et les rires à table!

Bon courage à tous mes collègues thésards qui vont encore devoir passer par là Vanessa Z., Sylvain, Vanessa T., Prisc (la couz cocotte !), Bruno, ☐

Merci à tous les copains et bons collègues que j'ai pu rencontrer! Votre compagnie a été très importante ! Vaness et Gwen et leur zoo (à part ta couleuvre peut-être, Gwen), Sylvain, Stephen, Pauline, Cécile, Céline B., Prisc (eh couz !) et Bruno, Tiatia, Vanessa T., Nico F., Caro, Michaël, Laetitia B., Guillaume B. (je ne t'oublierais pas!), Tariq, Julien, David, et tout ceux que je n'ai pas cités (dont toutes les troupes du quatrième et des labos voisins, du troisième, du deuxième, des Cézeaux, ☐ . ) !!!



Il y a des personnes sans qui tout ça aura été bien plus dur! Merci d'avoir été là dans des périodes vraiment difficiles, Diane (on a du battre pas mal de records téléphoniques !!!! Bon courage pour la nouvelle aventure! tu vas tout déchirer comme d'hab !). Un grand merci à Loulou ma co-parisienne (toutes ces soirées ☐ )! Grâce à toi je connais toutes les animaleries du coin, merci pour ta présence, ton écoute et ta franchise !

Merci à Loïc qui a osé l'impensable et qui ne s'est pas découragé à mes côtés. Qui m'as encouragé et cru en moi malgré mon humeur changeante au cours de la dernière année et qui supporte toutes mes affaires qui envahissent l'appart!!!

Et, « last but not least », ceux sans qui tout ça aurait été impossible, mes parents, mon petit frère ! Danke, dass Ihr immer an mich geglaubt habt und mich unterstützt habt, auch wenn ich es euch es bestimmt nicht immer einfach gemacht habe ☐ Ich hab euch ganz doll lieb !





## SOMMAIRE

Liste des abréviations .....	3
Liste des figures .....	7
Publications, Communications et Projets en cours.....	9
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
I Le développement embryonnaire.....	10
IA La fécondation et les premières divisions cellulaires.....	11
IA-1 La phase de clivage et la transition maternelle zygotique .....	11
IA-2 Polémique sur la polarité de l'embryon .....	12
IB Les premiers évènements de différenciation : la morula.....	13
IB-1 Compaction, polarisation et différenciation du TE .....	13
IC Le Blastocyste .....	19
IC-1 La formation du blastocyste.....	19
IC-2 Les acteurs moléculaires de la détermination Epr vs Epi.....	20
IC-3 La ségrégation EPr vs Epi.....	24
ID Implantation et devenir de l'EPr.....	27
IE Les cellules souches dérivés du blastocyste.....	29
IE-1 Les cellules de carcinome embryonnaire.....	29
IE-2 Les cellules souches embryonnaires.....	29
IE-3 Les cellules souches épiblastiques .....	30
IE-4 Les cellules souches extraembryonnaires .....	31
IE-5 les cellules souches et biologie du développement.....	32
IF Reprogrammation épigénétique au cours du développement préimplantatoire.....	34
IF-1 Méthylation de l'ADN.....	34
IF-2 Modifications d'histones.....	35
IF-3 Inactivation du X.....	36
II La voie de signalisation des rétinoïdes.....	37
IIA Vitamine A et acide rétinoïque dans l'organisme (fig.14) .....	37
IIB Métabolisme de l'acide rétinoïque au cours du développement.....	39
IIB-1 La synthèse de l'acide rétinoïque.....	39
IIB-2 la dégradation de l'acide rétinoïque.....	41
IIC Signalisation cellulaire : les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque .....	44



IIC-1 Structure et fonctionnement des récepteurs RAR et RXR .....	44
IIC-2 Mode d'action des RXR/RAR .....	45
IIC-3 Etudes développementales des récepteurs RAR et RXR .....	46
IIC-4 Acide rétinoïque et développement murin précoce, études sur les modèles <i>in vitro</i> .....	48
<b>III La signalisation Wnt .....</b>	<b>51</b>
<b>IIIA La voie de signalisation WNT canonique (fig.28) .....</b>	<b>52</b>
IIIA-1 les ligands Wnt .....	52
IIIA-2 Les récepteurs Frizzled et corécepteurs Lrp5 et Lrp6 .....	53
IIIA-3 Les principaux effecteurs de la voie .....	54
IIIA-4 Activation de la transcription des gènes cibles .....	55
<b>IIIB Les antagonistes sécrétés de la voie Wnt .....</b>	<b>57</b>
IIIB-1 les familles sFRP et Dkk1 .....	57
IIIB-2 Dkk1 .....	58
<b>IIIC La voie Wnt canonique dans l'embryogénèse précoce .....</b>	<b>59</b>
IIIC-1 Expression précoce des acteurs de la voie Wnt, <i>in vivo</i> .....	59
IIIC-2 La voie Wnt dans les modèles <i>in vitro</i> .....	60
<b>IV Raisonnements .....</b>	<b>62</b>
<b>IVA La voie de signalisation des rétinoïdes .....</b>	<b>62</b>
<b>IVB DKK1 : un inhibiteur spécifique de la voie WNT .....</b>	<b>63</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>64</b>
<b>I Etude de la voie des rétinoïdes .....</b>	<b>64</b>
<b>IA Présentation de l'étude d'expression sous forme d'article en cours de soumission .....</b>	<b>64</b>
<b>IB Effet de l'AR en culture d'embryon .....</b>	<b>72</b>
<b>II Etude du rôle de voie Wnt canonique dans la différenciation de l'EPr .....</b>	<b>73</b>
<b>IIA Etude de l'expression de Dkk1 in vivo et in vitro .....</b>	<b>73</b>
<b>IIIB Discussion sur l'expression et la fonction de Dkk1 dans la différenciation de l'EPr .....</b>	<b>74</b>
<b>III Différenciation de l'EPr et ségrégation avec l'Epi .....</b>	<b>78</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>80</b>
Extraction d'ARN, Reverse transcription et quantification .....	80
Cultures d'embryons .....	80
Immunomarquages .....	80
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>82</b>



## Liste des abréviations

### A

Adh	Aldéhyde DesHydrogénase
ADNc	ADN complémentaire
APC	Adenomatous Polyposis Coli
a-PKC	atypical Protein Kinase C
AR	Acide Rétinoïque
AR9cis	Acide Rétinoïque 9-cis
ARtt	Acide Rétinoïque tout-trans
AVE	Endoderme Viscéral Antérieur

### B

BE	Bouton Embryonnaire
----	---------------------

### C

CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinases
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
Cdx2	Caudal type homeobox 2
CE	Corps Embryonnaire
Cerl	Cerberus-like
CK1 $\alpha$	Casein Kinase 1 $\alpha$
CRABP	Cellular Retinoic Acid Binding Protein
CRBP	Cellular Retinol Binding Protein
CRD	Cystein Rich Domain
CTE	C-Terminal Extension
Cyp26	Cytochrome P26

### D

Dkk1	Dickkopf1
Dvl	Dishevelled



## **E**

EC	cellules de Carcinome Embryonnaire
Eff	Efficacité de PCR
Emk1	ELKL motif kinase 1
Epi	Epiblaste
EPr	Endoderme Primitif
ERV	Endogenous RetroVirus-like
ES	cellules Embryonnaires Souches
ET	Element Transposable

## **F**

Fgf	Fibroblast Growth Factor
Fgfr	Fibroblast Growth Factor Receptor
Fz	Frizzled

## **G**

GPCR	G-Protein Coupled Receptors
Grb2	Growth factor Receptor-Bound protein 2
Gsk3	Glycogen Synthase Kinase 3

## **H**

Hex	Hexamer
-----	---------

## **I**

IAP	Intracisternal-A particles
-----	----------------------------

## **L**

LIF	Leukemia Inhibitory Factor
Lrp	Low density lipoprotein Receptor-bound Protein
LTR	Long Terminal Repeats

## **M**

Mapk	Mitogen Activated Protein Kinase
MCI	Masse Cellulaire Interne





## N

NCoR      Nuclear Receptor Corepressor

## P

PAR      Partitioning Defective

PCP      Planar Cell Polarity

Pdgfra Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\alpha$

PE      Endoderme Pariétal

PFA      ParaFormaldéhyde

PKC      Protein Kinase C

pré-Epi      précurseur d'Epiblaste

pré-EPr      précurseur d'Endoderme Primitif

## R

Raldh      RétinAldéhyde DésHydrogénase

RAR      Retinoic Acid Receptor

RARE      Retinoic Acid Response Element

RBP      Retinol Binding Protein

RDH      Rétinol Déshydrogénase

RT-PCR      Real Time Polymerase Chain Reaction

RTK      Recepteur Tyrosine Kinase

RXR      Retinoic X Receptor

## S

sFRP      secreted Frizzled Related Protein

SMRT      Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors

SSEA      Stage Specific Embryonic Antigen

SVF      Sérum Bovin Fœtal

## T

T      Brachyury

Tcf/Lef      T Cell Factor / Lymphoid Enhancer Factor

TE      Trophectoderme

Tead4      Transcriptional Enhancer Activator Domain



TS	cellules Souches de Trophectoderme
TZM	Transition Maternelle-Zygotique
<b>V</b>	
VE	Endoderme Viscéral
<b>W</b>	
Wg	Wingless
Wnt	Wingless-Related MMTV integration site
<b>X</b>	
XEN	cellules Souches d'ENdoderme eXtra-embryonnaire
<b>Z</b>	
ZGA	Zygotic Genome Activation
ZP	Zone Pellucide



## Liste des figures

- Fig.1** : Les grandes étapes du développement préimplantatoire
- Fig.2** : Morphologie et schématisation des embryons au cours du développement préimplantatoire
- Fig.3** : Modèle de ségrégation entre trophoctoderme et la masse cellulaire interne
- Fig.4** : Profils d'expression de Oct4 et Cdx2
- Fig.5** : Schéma des interactions moléculaires dans la différenciation entre trophoctoderme et masse cellulaire interne vs MC
- Fig.6** : Modèle de l'épithélialisation en l'endoderme primitif
- Fig.7** : Expression préimplantatoire de Nanog
- Fig.8** : Expression préimplantatoire de Gata6 et Gata4
- Fig.9** : Schéma du début du développement postimplantatoire
- Fig.10** : Schéma des différenciation cellulaire in vivo entre les stades E3.5 et E6.0
- Fig.11** : Possibilités de différenciation de cellules EC in vitro
- Fig.12** : Potentiel de différenciation des cellules ES in vitro
- Fig.13** : Schématisation de l'autorenouvellement et le maintien de la pluripotence de cellules ES
- Fig.14** : Grandes fonctions des rétinoïdes chez l'homme et la femme
- Fig.15** : Transport, métabolisme et signalisation des rétinoïdes dans les cellules embryonnaires
- Fig.16** : Activité de la voie des rétinoïdes
- Fig.17** : Synthèse et dégradation de l'acide rétinoïque
- Fig.18** : Synthèse et activité d'AR in vivo
- Fig.19** : Modèle de protection de l'épiblaste contre l'AR maternel
- Fig.20** : Schéma de la structure commune de la superfamille des récepteurs nucléaires
- Fig.21** : Eléments de réponse à l'AR
- Fig.22** : Expression précoce des récepteurs à l'acide rétinoïque RAR et RXR
- Fig.23** : Tableau récapitulatif de l'expression des récepteurs à l'acide rétinoïque
- Fig.24** : Tableaux récapitulatifs des principaux phénotypes observés pour les mutations nulles des récepteurs à l'acide rétinoïque
- Fig.25** : Absence de différenciation des cellules F9 en EPr et dérivés suite à l'inactivation de l'hétérodimère RXR $\alpha$ /RAR $\gamma$



<b>Fig.27</b>	: Les trois voies de signalisation WNT
<b>Fig.28</b>	: Schéma de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine
<b>Fig.29</b>	: Structure des 5 membres de la famille DKK
<b>Fig.30</b>	: Caractérisation fonctionnelle de Dkk1 in vivo
<b>Fig.31</b>	: Expression in vivo de <i>Dkk1</i> par hybridation in situ
<b>Fig.32</b>	: Expression par RT-PCR quantitative de différents acteurs de la signalisation Wnt au cours de l'embryogenèse précoce chez la souris
<b>Fig.33</b>	: Expression nucléaire de la $\beta$ -caténine
<b>Fig.34</b>	: Expression de la $\beta$ -caténine nucléaire dans les cellules ES humaines
<b>Fig.35</b>	: Traitement d'embryons en culture par Artt
<b>Fig.36</b>	: Expression de <i>Dkk1</i> dans l'embryon préimplantatoire
<b>Fig.37</b>	: Profil d'expression de Dkk1 dans l'embryon préimplantatoire
<b>Fig.38</b>	: Evolution de l'expression de Dkk1 dans l'embryon comparativement à Gata6 et Nanog
<b>Fig.39</b>	: Modèle de spécification de l'Epi , de l'EPr et du TE
<b>Fig.40</b>	: Schématisation du protocole de conétique de différenciation de cellules F9
<b>Fig.41</b>	: Anticorps utilisés dans l'étude





## **Publications, Communications et Projets en cours**

### **Publications :**

*En cours :*

- Publication sur le rôle de l'acide rétinoïque dans la différenciation de l'EPr

### **Posters :**

Meeting de la Société Française de Biologie du Développement 2007 :

- « Role of retinoids during primitive endoderm formation in mouse »
- « Retrovirus-mediated misexpression of Ptf1a during chick visual development results in an aberrant retinal lamination and in a modification of the retinal cell composition »

### **Communications :**

- Journées de l'Ecole Doctorale 2008 : « Rôle de l'acide rétinoïque dans la formation de l'endoderme primitif chez la souris »
- Workshop « Embryogenèse précoce de la souris » à Oxford, juillet 2009 : « Facteur génétiques dans la différenciation de l'Endoderme primitif »



## Etude Bibliographique



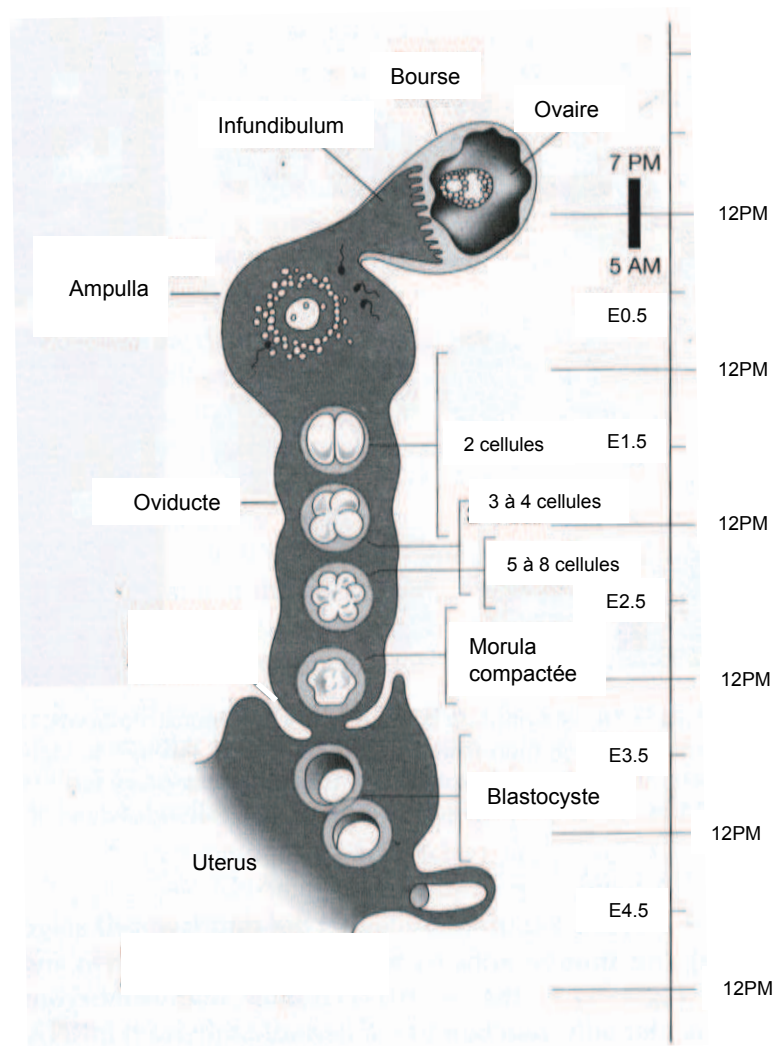
# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I Le développement embryonnaire**

Le développement regroupe tous les événements allant de la fécondation d'un ovule par un spermatozoïde à la naissance d'un organisme complexe viable. Il est composé de deux phases majeures : le développement embryonnaire et le développement fœtal. Le développement embryonnaire correspond au laps de temps entre le jour 0 ou E0 (fécondation) jusqu'au début de l'organogenèse vers E8.5. Lors de cette première phase, on distingue également deux étapes : le développement pré- et postimplantatoire. Séparées par l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine, la deuxième consiste majoritairement par la mise en place des premiers axes et des feuilletts embryonnaires pendant la gastrulation.

Le développement préimplantatoire débute avec la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde au jour 0 (E0). Le zygote entre dans une phase de clivages pour former à E2.5 un embryon composé de huit cellules équipotentes. Elles vont alors se compacter et se polariser. Les divisions cellulaires suivantes permettront d'obtenir une population de cellules externes et une population de cellules internes. À E3.5, le TE issu des cellules externes entoure la masse cellulaire interne (MCI) et la cavité blastocœlique. L'embryon va s'implanter dans la paroi utérine autour de E4.5. Il est alors constitué de 3 tissus morphologiquement distinguables : le trophectoderme, l'épiblaste et l'endoderme primitif, un épithélium à la limite entre l'Epi et la cavité blastocœlique.

Dans la suite de ce chapitre, j'exposerais plus en détails certains aspects du développement embryonnaire et de la différenciation de l'endoderme primitif.



**Fig.1** : Les grandes étapes du développement préimplantatoire (schéma traduit de Nagy *et al.*, 2003)

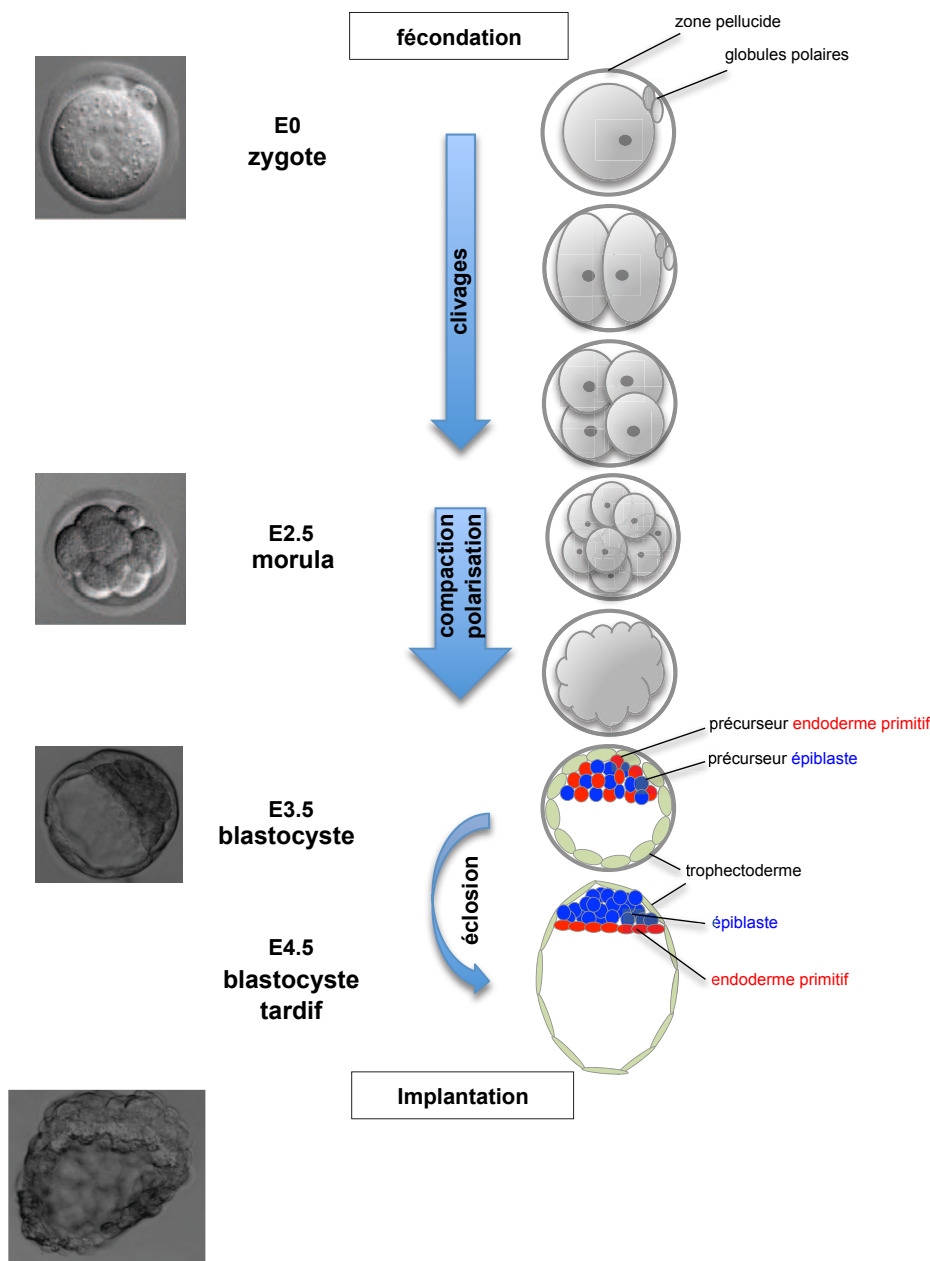
## ***IA La fécondation et les premières divisions cellulaires***

### **IA-1 La phase de clivage et la transition maternelle zygotique**

La fécondation conduisant à la formation du zygote est considérée comme le point de départ du développement embryonnaire. Le spermatozoïde mature acquiert sa capacité de fécondation une fois relâché dans le tractus génital femelle. Il va rejoindre l'ampulla où a lieu la fécondation (fig.1 et 2). Le spermatozoïde va entrer en contact avec la zone pellucide de l'ovocyte bloqué en métaphase de la deuxième méiose. L'interaction entraîne l'activation de l'acrosome spermatique, la libération d'enzymes protéolytiques et la fusion entre les gamètes. Le contenu spermatique est déversé dans le cytoplasme de l'ovocyte ce qui induira la fin de la deuxième méiose ovocytaire avec l'expulsion d'un second globule polaire. Les deux pronoyaux, maternel et paternel, ainsi formés migrent vers le centre du zygote en répliquant leur ADN, mais leur fusion ne sera complète qu'à la première mitose. Ces premières divisions cellulaires asynchrones et totales se font sans croissance. Les cellules formées lors de cette phase sont appelées blastomères.

Alors que le spermatozoïde apporte l'information génétique paternelle, le cytoplasme de l'ovocyte contient d'importantes quantités d'ARN et de protéines. Ces stocks permettent à l'embryon, transcriptionnellement inactif, de fonctionner jusqu'à l'activation de son propre génome (ZGA). On parle alors de la transition maternelle-zygotique ou TZM. En effet, il y a destruction spécifique des transcrits maternels, leur remplacement par les transcrits zygotiques et une reprogrammation importante de l'expression génique. Il est généralement admis que la ZGA a lieu au stade 2 cellules avec une rapide dégradation des ARNs maternels, mais il existe une transcription active dès le stade zygote (Bouniol et al., 1995). La transition entre les stocks maternels et l'activation du génome zygotique n'est pas quelque chose de ponctuel et dépend du gène concerné. L'absence de phénotype préimplantatoire pour certains mutants nuls peut donc être dû à la présence de molécules maternelles même à des stades avancés du développement préimplantatoire. Il a été montré, grâce à la déplétion génétique de l'*E-cadhérine* maternelle, que celle-ci joue un rôle important dans l'embryon bien après l'activation de son propre génome. Les blastomères, normalement adhérents, de ces embryons se dissocient en absence de la zone pellucide et ce jusqu'au stade 8 cellules (De Vries et al.,





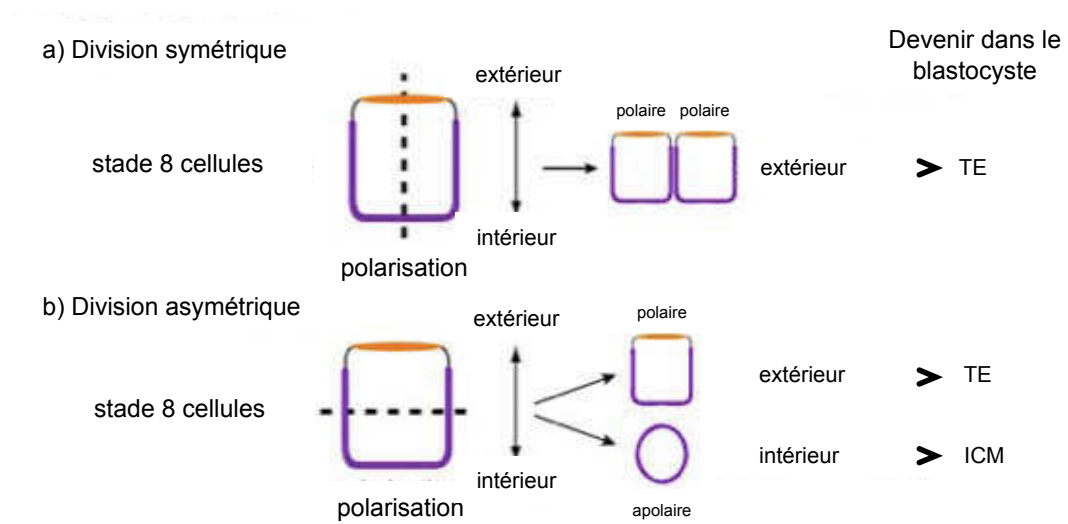
**Fig.2** : Morphologie et schématisation des embryons au cours du développement préimplantatoire : le zygote néoformé subit une série de clivages. Au stade 8 cellules (E2.5) l'embryon se compacte et les cellules se polarisent. Après cavitation on obtient un blastocyste formé du trophoctoderme et d'une masse cellulaire interne hétérogène. Le blastocyste va éclore de la zone pellucide et s'implanter dans la paroi utérine (E4.5). L'embryon est alors composé de trois types cellulaires distincts : le trophoctoderme (vert pâle), l'épiblaste (bleu) et l'endoderme primitif (rouge).

2004). L'utilisation de la CRE sous contrôle du promoteur de ZP3 (Zona pellucida 3) ou de la PGK permet l'excision de séquences géniques grâce au système Cre/Lox dans l'ovocyte en maturation avant la transcription maternelle (de Vries et al., 2000; Lallemand et al., 1998).

## **IA-2 Polémique sur la polarité de l'embryon**

Dans la majorité des espèces le zygote et l'embryon précoce présentent des gradients moléculaires hérités maternellement ou mis en place à la fécondation. Aucun gradient de ce type n'a été détecté pour les mammifères à ce jour. Ceci a conduit à l'hypothèse qu'il n'y aurait ni prédétermination d'axes, ni polarité existante. Le fait que jusqu'au stade 8 cellules, les blastomères isolés peuvent régénérer la polarité d'un embryon va dans ce sens. Cependant, durant la dernière dizaine d'année est née une polémique opposant les équipes pour et contre la détermination des axes et la polarité précoce dans l'embryon de souris.

Initialement, le globule polaire était considéré comme immobile et définissant ainsi l'axe animal-végétal du zygote (Gardner, 1997). Des expériences de vidéomicroscopie ont montré que le globule polaire bouge lors des clivages (Hiiragi and Solter, 2004), allant à l'encontre d'un axe prédéfini. Certains voient une organisation des premiers clivages (Zernicka-Goetz, 2006), l'associant entre autres au point d'entrée du spermatozoïde (Plusa et al., 2002). Les blastomères auraient des propriétés développementales différentes dès le stade 2 cellules (Gardner, 2001; Piotrowska et al., 2001; Piotrowska-Nitsche et al., 2005; Piotrowska-Nitsche and Zernicka-Goetz, 2005). En revanche, d'autres mettent en avant une contribution non biaisée des blastomères au stade 2 cellules et montrent que leurs cellules filles participent à tous les tissus du blastocyste (Alarcon and Marikawa, 2005; Chroscicka et al., 2004). Des expériences de vidéomicroscopie confirment ces résultats (Louvet-Vallee et al., 2005).



**Fig.3** : Modèle de ségrégation entre trophoblaste (TE) et la masse cellulaire interne (MCI) (traduit de Yamanaka *et al.*, 2006)

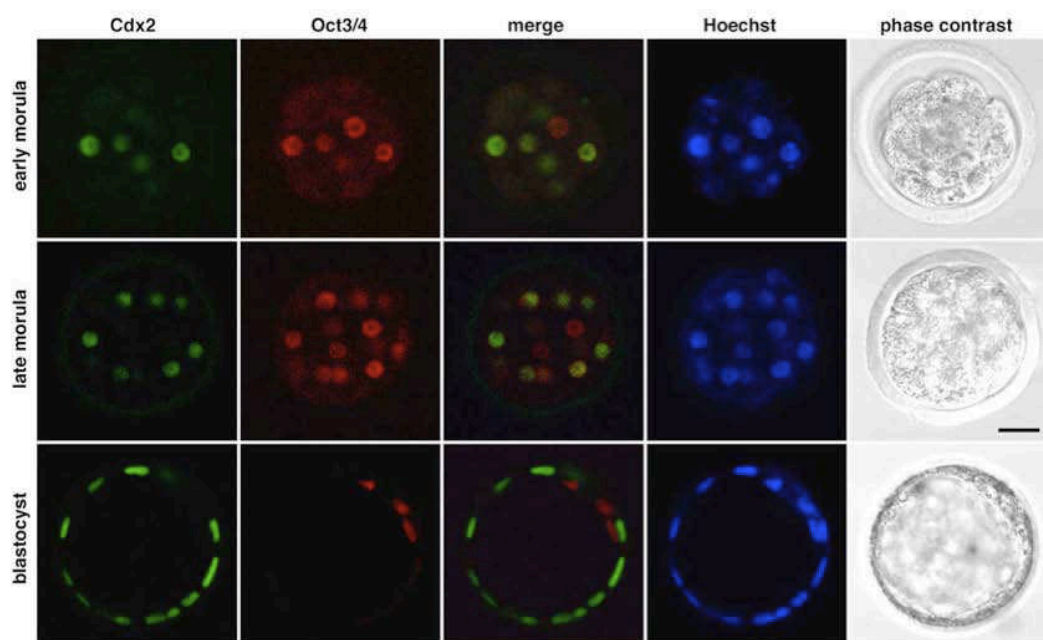
## ***IB Les premiers évènements de différenciation : la morula***

Après cette première phase de clivages, 2 premiers tissus de l'embryon sont mis en place. En deux étapes, une population externe et une interne ségrégent puis le trophoctoderme (externe) et la masse cellulaire interne se différencient.

### **IB-1 Compaction, polarisation et différenciation du TE**

Après 2 jours et demi de développement, l'embryon, aussi appelé morula, est composé de 8 blastomères équipotants (fig.2). Ils sont peu adhérents et facilement distinguables. D'importants remaniements structuraux et moléculaires vont alors avoir lieu. Les cellules augmentent leurs surfaces de contact, elles se compactent et se polarisent. La polarisation des blastomères se fait selon le rayon de l'embryon. Elle se traduit par des remaniements moléculaires et une distribution différentielle des composants cellulaires. On peut observer une distribution essentiellement apicale des microvilli, auparavant repartis tout au tour de la cellule, ainsi que du système d'exocytose. Le noyau et l'appareil de Golgi se localisent au pôle basal. Différentes protéines vont jouer un rôle dans la réorganisation des blastomères (Johnson and McConnell, 2004). Nombreuses protéines impliquées dans la morphologie, la polarité et les jonctions cellulaires vont être distribuées spécifiquement. L'Ezrine et certains membres de la famille PAR (« Partitioning Defective ») et a-PKC (« atypical Protein Kinase C ») sont localisés apicalement alors que d'autres comme l'E-cadhérine et EMK1 sont distribués basolatéralement (Yamanaka et al., 2006).

La polarisation des blastomères va établir le destin des cellules issues de divisions suivantes. En effet, entre 8 et 16 cellules, il y a ségrégation de deux populations distinctes. Les divisions parallèles au rayon de l'embryon, symétriques ou conservatrices, donnent naissance à deux cellules identiques, polaires et externes alors que les divisions perpendiculaires à ce rayon, asymétriques, engendrent une cellule polaire, externe et une cellule apolaire et interne. Il est maintenant établi que le trophoctoderme (TE) dérive des cellules externes, alors que la masse cellulaire interne (MCI) dérive de la population interne (Bischoff et al., 2008; Fleming, 1987). Ce modèle basé sur la polarité schématise les premiers événements de la ségrégation entre TE et ICM (fig.3). La différenciation des deux tissus



**Fig.4** : Profils d'expression de Oct4 et Cdx2 entre la morula et le blastocyste (Niwa *et al.*, 2005)

cependant n'est accomplie qu'au stade blastocyste. Différents facteurs ont été mis en évidence ici.

Les cellules externes et internes ségrégent en deux vagues de divisions asymétriques produisant les cellules internes primaires et les cellules internes secondaires. Il avait été proposé que la première vague produisait préférentiellement des cellules donnant l'Epi et la deuxième donnant des cellules de l'EPr (Yamanaka et al., 2006). Des expériences récentes de vidéomicroscopie ont permis de montrer que 60% des blastomères à huit cellules donnent des cellules internes primaires contre seulement 25% donnant des cellules internes secondaires. Au stade 32 cellules, 9 à 10 cellules seraient donc issues des cellules internes primaires et seulement 2 à 3 des cellules internes secondaires (Yamanaka et al., 2010). De plus, cette étude montre que les cellules internes primaires ou secondaires ne participent pas préférentiellement à l'Epi ou l'EPr (Yamanaka et al., 2010).

*Cdx2* est un facteur clé de la différenciation du TE. Ce facteur de transcription de type Caudal-like, est exprimé dans la majorité des cellules dès le stade E2,5 et progressivement restreint aux cellules externes (fig.4) (Dietrich and Hiiragi, 2007; Ralston and Rossant, 2008). Les embryons délétés pour *Cdx2* sont capables de former un blastocyste, mais l'intégrité du TE ne peut pas être maintenue et ils sont incapables de s'implanter (Strumpf et al., 2005). En effet, la cavité formée s'effondre alors que les embryons sauvages éclosent de la zone pellucide. Les cellules du TE perdent leur aspect épithélial ainsi que la localisation correcte de marqueurs épithéliaux tels que ZO-1 et l'E-Cadhérine (Strumpf et al., 2005). Dans ces mutants, la différenciation du TE n'est pas complète : d'autres marqueurs comme *Eomes* et *Krt8* sont absents (Ralston and Rossant, 2008; Strumpf et al., 2005). Dans des expériences de chimérisme par agrégation de cellules sauvages avec des cellules *Cdx2*<sup>-/-</sup>, aucune préférence interne ou externe n'a été observée indiquant que *Cdx2* agirait en aval de la polarisation des cellules externes (Ralston and Rossant, 2008). En revanche, une autre équipe a montré, par la création de « chimères » par injection d'un blastomère au stade 2 cellules pour inhiber ou surexprimer *Cdx2*, que *Cdx2* favorise leur localisation extérieure (Jedrusik et al., 2008). Une hétérogénéité de la localisation apicale de transcrits de *Cdx2* entre 8 et 16 cellules influencerait selon eux sur le devenir des cellules externes et favoriserait les divisions symétriques (Jedrusik et al., 2008). Il ne s'agit ici que d'un léger biais dans le devenir des cellules. Dans l'embryon il est clair que la polarisation des cellules externes est à l'origine de leur différenciation en cellules du TE et cette polarisation serait à l'origine d'une induction de *Cdx2* dans le TE (Dietrich and Hiiragi, 2007; Fleming, 1987; Ralston and Rossant, 2008;



Strumpf et al., 2005). De plus, son expression forcée induit la différenciation des cellules ES en cellules trophectodermales et inhibe l'expression de marqueurs de la MCI comme Oct4, Nanog (Niwa et al., 2000; Strumpf et al., 2005). Les expériences de gène rapporteur et de FRET (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfert) indiquent qu'il existe un blocage direct de l'expression de Oct4 par Cdx2 et inversement dans les cellules ES. Les résultats de ChIP (**C**hromatine **I**mmuno **P**recipitation) montrent que Cdx2 est capable de lier directement la région promotrice d'Oct4 proche de et sur son élément autorégulateur (Niwa et al., 2000). Une autre équipe met également en évidence une régulation croisée entre Oct4, Nanog et Cdx2 (Chen et al., 2009). Par CHiP, ils montrent que Oct4, Nanog et Cdx2 lient le promoteur et le premier intron de Cdx2 pour réprimer son expression dans les cellules ES indifférenciées. En revanche, dans les cellules ES différenciées en TE ni Nanog, ni Oct4 n'ont d'effet, mais Cdx2 autoactive sa transcription (Chen et al., 2009). Oct4 et Cdx2 sont également capables de lier la région promotrice de Nanog (Chen et al., 2009; Loh et al., 2006). Ces résultats essentiellement obtenus grâce aux études *in vitro*, sont en accord avec les observations qui ont pu être faite *in vivo* au niveau des mutants. Notamment, Nanog et Oct4 sont exprimés de manière aberrante dans les mutants Cdx2 suggérant leur inhibition par ce dernier (Strumpf et al., 2005). De plus, dans les embryons Nanog<sup>-/-</sup>, on peut observer un léger marquage nucléaire pour Cdx2 indiquant que Nanog pourrait jouer un rôle dans la répression de Cdx2 dans la MCI (Chen et al., 2009).

Le phénotype d'embryons *Eomes*<sup>-/-</sup> est semblable à celui des *Cdx2*<sup>-/-</sup>. Ils meurent autour de l'implantation suite à des problèmes de maintien de l'intégrité du TE (Russ et al., 2000). Les mutants pour ce facteur de transcription T-box ne perdent pas l'expression de *Cdx2* ce qui place *Eomes* en aval de *Cdx2* (Ralston and Rossant, 2008).

Toujours est-il que ni dans le cas des embryons délétés pour *Cdx2* ni dans celui des embryons délétés pour *Eomes* l'épithélium externe n'est entièrement absent, mais ne peut être maintenu. Il doit donc exister des facteurs importants en amont de *Cdx2* jouant un rôle dans la détermination du TE. Plusieurs équipes ont mis en évidence un nouveau facteur de transcription requis pour l'expression de *Cdx2* : TEAD4. Le phénotype des embryons *Tead4*<sup>-/-</sup> est plus sévère que pour *Cdx2* puisqu'ils ne forment pas de blastocystes (Nishioka et al., 2008; Yagi et al., 2007). Néanmoins, l'expression de *Tead4* est ubiquitaire et requiert donc d'autres facteurs pour son rôle dans l'induction de *Cdx2*. Récemment, il a été montré que l'activité de TEAD4 est restreinte au TE par son co-activateur Yap. Yap est phosphorylé par Lats1/2 dans les cellules internes ce qui empêche sa localisation nucléaire et Yap ne peut





interagir avec TEAD4 uniquement dans le TE pour induire Cdx2 (Nishioka et al., 2009). Il a été proposé que la phosphorylation de Yap par Lats1/2 dépendrait des contacts cellule à cellule. Lats1/2 serait ainsi activé via la voie Hippo dans les cellules internes et donc avec un grand nombre de contacts intercellulaires pour phosphoryler Yap et ainsi empêcher l'activation transcriptionnelle de gènes TE-spécifiques comme Cdx2 par Tead4 (fig.5) (Nishioka et al., 2009).

Le gène *Gata3*, codant pour une protéine de la famille des facteurs de transcription GATA, a été identifié comme jouant un rôle dans la différenciation du TE. *Gata3* est exprimé préférentiellement dans les cellules souches trophoblastiques (TS) (Home et al., 2009; Ray et al., 2009) et son expression est induite lors de la différenciation de cellules ES en TE (Xu et al., 2002). La surexpression de *Gata3* dans les cellules ES induit leur différenciation en cellules TS, mais contrairement à *Cdx2*, ces cellules ne peuvent être maintenues à l'état indifférencié (Ralston et al., 2010). *In vivo*, les immunomarquages montrent l'expression TE-spécifique de *Gata3* au cours du développement préimplantatoire sa colocalisation avec *Cdx2* à ces stades (Home et al., 2009; Ralston et al., 2010). Aucun phénotype préimplantatoire n'a été observé dans les mutants *Gata3*<sup>-/-</sup> (Pandolfi et al., 1995). En revanche, l'inhibition de *Gata3* par ARN interférence dès le stade 2 cellules bloque le passage de la morula au blastocyste dans la majorité des embryons et entraîne une baisse de l'expression de *Cdx2* (Home et al., 2009). *Gata3* est capable de réguler positivement la transcription de *Cdx2* (Home et al., 2009), mais *Gata3* peut également induire l'expression de gènes trophoblastiques qui ne sont pas régulés par *Cdx2* et inversement (Ralston et al., 2010). *Gata3* et *Cdx2* peuvent induire indépendamment l'identité trophoblastique dans les cellules ES, dans les mutants pour *Cdx2*, l'expression de *Gata3* n'est pas perdue et la baisse de *Gata3* entraîne une baisse mais pas une perte de *Cdx2* (Home et al., 2009; Ralston et al., 2010). *Gata3* et *Cdx2* pourraient donc agir en parallèle dans la différenciation du TE. En revanche, *Gata3* serait plutôt un facteur de maturation trophoblastique étant incapable de permettre le maintien d'une lignée stable de cellules TS. En effet, dans les embryons *Tead4*<sup>-/-</sup>, l'expression de *Gata3* baisse suggérant que *Tead4* permettrait le maintien de l'expression de *Gata3* (Ralston et al., 2010).

L'identité du TE, définie entre les stades 32 et 64 cellules (Johnson and Ziomek, 1983; Suwinska et al., 2008), est caractérisée par la restriction aux cellules externes de l'expression de *Cdx2* et *Gata3* (Dietrich and Hiiragi, 2007; Home et al., 2009; Ralston et al., 2010; Ralston



and Rossant, 2008; Strumpf et al., 2005). Cette restriction est la conséquence de la polarisation des blastomères au stade 8 cellules et de leur localisation (interne/externe) ultérieure. La spécification de la MCI pourrait ainsi être la conséquence de l'absence de marqueurs trophoblastiques dans les cellules internes. Elle est caractérisée par l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de la pluripotence comme Oct4 et Sox2.

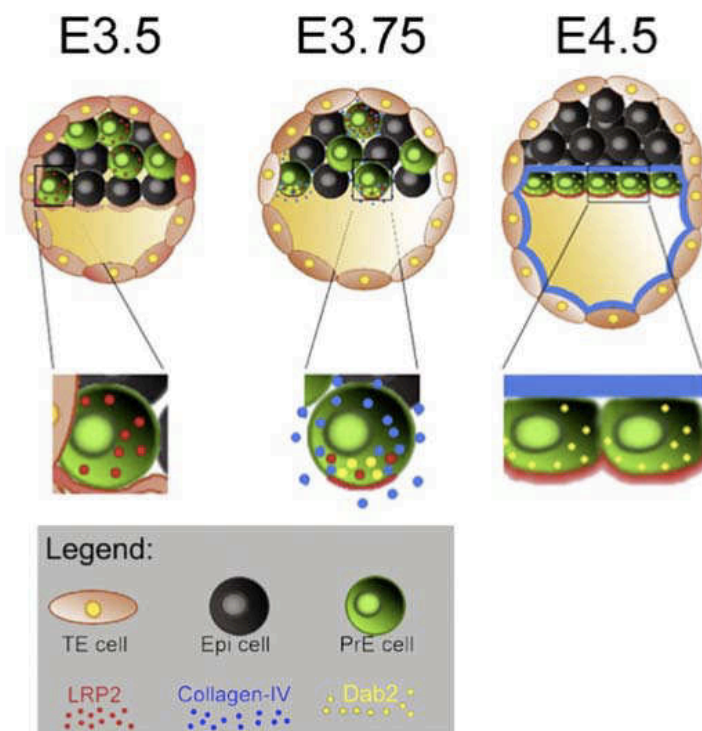
Oct4 est un facteur de transcription portant un « domaine POU » de liaison à l'ADN. Il est présent dans tous les noyaux d'un embryon jusqu'au stade 8 cellules et se restreint à la MCI par la suite (fig.4) (Palmieri et al., 1994). Les mutants délétés pour Oct4 forment des blastocystes avec un TE fonctionnel mais meurent suite à l'absence de dérivés épiblastiques et endodermiques. La dérivation de cellules ES est impossible dans ces embryons et l'expression de Troma-1, spécifique du TE témoigne d'une mauvaise spécification des cellules (Nichols et al., 1998). Lorsque Oct4 est réprimé dans les cellules ES, elles se différencient en TE et expriment Cdx2 (Niwa et al., 2000). De façon similaire, la surexpression de Cdx2 dans ces cellules va entraîner la perte d'expression d'Oct4 et la différenciation en trophoblastes (Niwa et al., 2005). Cdx2 et Oct4 se répriment mutuellement dans la ségrégation du TE et de la MCI.

Un autre marqueur de la MCI est le facteur de transcription Sox2. Il est exprimé spécifiquement dans les cellules de la MCI et de ses dérivés (Avilion et al., 2003). Les embryons *Sox2*<sup>-/-</sup> sont incapables de maintenir l'épiblaste et meurent autour de l'implantation. Ceci est confirmé par la culture d'explants composés uniquement de trophoblastes géants et d'endoderme extraembryonnaire (Avilion et al., 2003). Les expériences *in vitro* ont permis de montrer que Oct4 et Sox2 agissent en synergie directement sur le promoteur de *Nanog* pour activer sa transcription (Kuroda et al., 2005; Rodda et al., 2005). Cette synergie est également observée dans une boucle autorégulatrice positive où le couple Oct4/Sox2 entretient leur activité transcriptionnelle via la directe liaison à leur promoteurs (Chew et al., 2005; Okumura-Nakanishi et al., 2005).

*Rex1* (ou *Zfp42*) est exprimé majoritairement dans les cellules de carcinome embryonnaire et les cellules souches et cette expression baisse lorsque les cellules sont traitées par des agents de différenciation tel que l'AR (Hosler et al., 1989; Rogers et al., 1991). Malgré le peu de caractérisation, ce gène est couramment utilisé comme un marqueur de pluripotence. Dans l'embryon est spécifique de l'Epi à E4.5 (Rogers et al., 1991). Il a été montré que les cellules F9 *Rex1*<sup>-/-</sup> sont incapables de se différencier en EPr par l'AR



(Thompson and Gudas, 2002). L'invalidation de Rex1 dans les cellules souches embryonnaires a mis en évidence qu'il n'est pas requis pour le maintien de leur pluripotence (Masui et al., 2008). Elles expriment Nanog et Oct4 à des niveaux équivalents des cellules sauvages mais présentent une légère baisse de marqueurs de l'EPr tel que Sox7, mais Gata6 ou Gata4 ne varient pas (Masui et al., 2008). Les souris *Rex1*<sup>-/-</sup> sont viables, Rex1 n'est donc pas requis dans le maintien de la pluripotence de l'Epi, ni dans la différenciation de l'Epr (Masui et al., 2008).



**Fig.6** : Modèle de l'épithélialisation en l'endoderme primitif (PrE). A E3.5 les précurseurs de l'Epi et du PrE sont réparties au hasard dans la MCI. Les cellules ne sont pas encore polarisées et quelques unes commencent à exprimer Lrp2. A E3.75 les précurseurs sont toujours répartis au hasard le nombre de cellules co-exprimant Lrp2 et Collagène-IV augmente. Les cellules à la surface de la cavité blastocoelique se polarisent individuellement par l'accumulation apicale de Lrp2 et Dab2. A E4.5 les cellules du PrE forment un épithélium polarisé avec l'accumulation apicale de Lrp2 et Dab2 et basale de Collagène-IV. (Gerbe *et al.*, 2008)

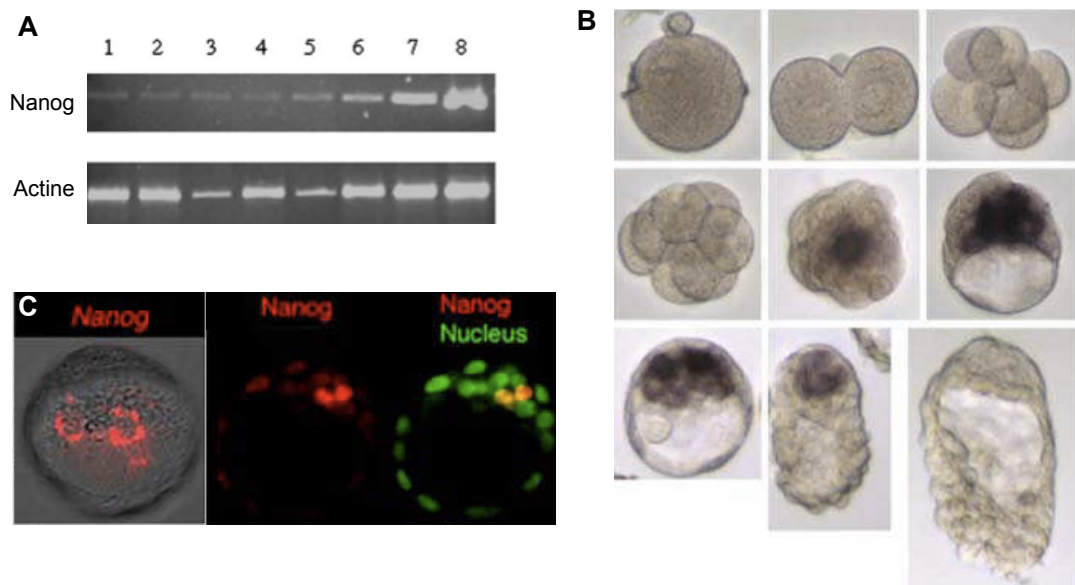
## ***IC Le Blastocyste***

### **IC-1 La formation du blastocyste**

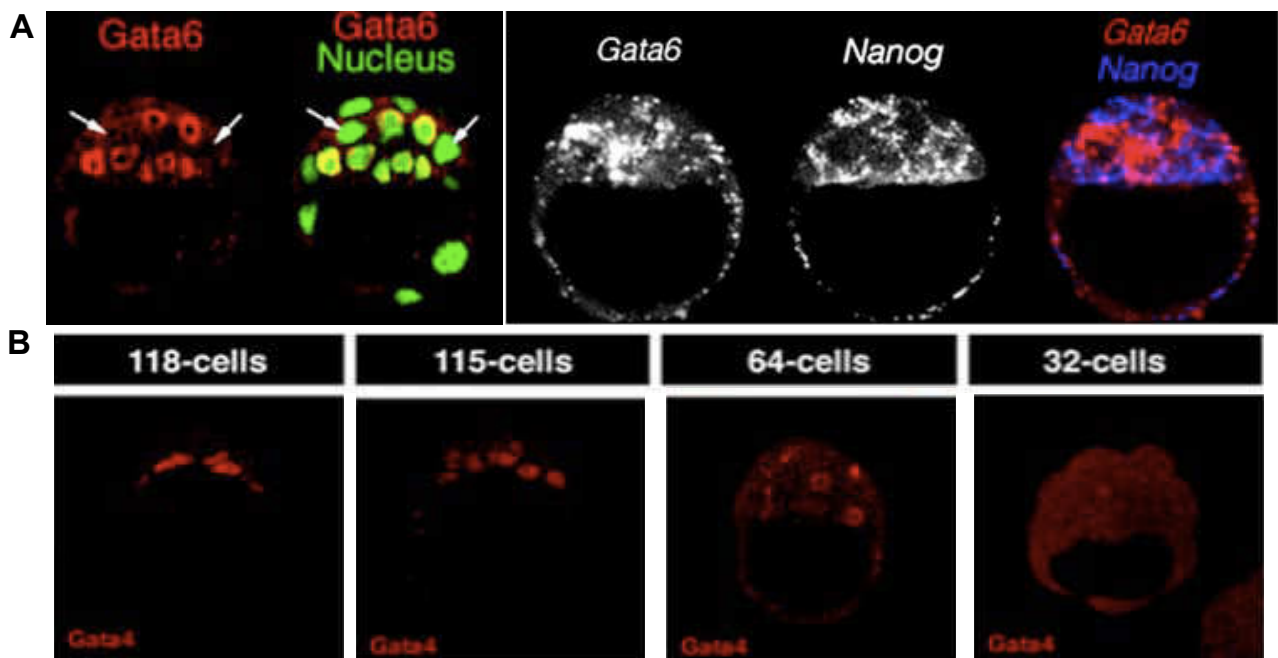
A E3.5, on appelle l'embryon « blastocyste » (fig.2). Ce nom vient de la présence du blastocœle. Cette cavité se forme grâce à l'accumulation d'eau par osmose à travers le TE. On sait maintenant que la distribution asymétrique, au pôle basolatéral, de Na/K-ATPases permet le maintien d'un gradient ionique et qu'il y a présence d'aquaporine fonctionnelles dans l'embryon préimplantatoire au niveau du TE (Watson et al., 2004). La formation du blastocœle va excentrer la MCI, les deux étant toujours entourés par le TE.

À E4.5, la différenciation et la mise en place de l'endoderme primitif (EPr) et l'épiblaste (Epi) sont achevés (fig.2). Longtemps considérée comme une masse de cellules équipotentes, elle est en fait un mélange de précurseurs de l'Epi (pré-Epi) et de l'EPr (pré-EPr) (Chazaud et al., 2006; Rossant et al., 2003). En effet, il a été montré que Gata6, un marqueur de l'EPr (Koutsourakis et al., 1999; Morrissey et al., 1998), et Nanog, un marqueur de l'Epi (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003), sont exprimés selon un motif « poivre et sel » (Chazaud et al., 2006). L'identité de ces précurseurs est déjà déterminée comme le montrent les expériences de lignage cellulaire où la descendance d'une cellule unique marquée ne peut participer qu'à l'Epi ou à l'EPr, mais jamais aux deux tissus simultanément (Chazaud et al., 2006). La réalisation de chimères entre une cellule unique marquée isolée de la MCI d'un blastocyste précoce et réinjectée dans un autre blastocyste montre que cette détermination est indépendante de l'environnement de la cellule (Chazaud et al., 2006). D'autres équipes ont également mis en évidence cette hétérogénéité par des analyses d'ADNc (Kurimoto et al., 2006). Des marquages immunofluorescents et la transgénèse ont mis en évidence un marquage en poivre et sel dans la MCI pour Nanog et Pdgfra un marqueur contesté de l'EPr (Dietrich and Hiiragi, 2007; Plusa et al., 2008; Ralston and Rossant, 2008). Ces données ont permis l'établissement d'un nouveau modèle pour la formation de l'EPr. Ainsi, les cellules déterminées « au hasard » au sein de la MCI doivent subir un tri afin de former un épithélium fonctionnel à la surface de l'Epi (fig.6).





**Fig.7** : Expression préimplantatoire de Nanog. (A) Expression par RT-PCR (1: ovocyte, 2: zygote, 3: 2 à 4 cellules, 4: 4 à 5 cellules, 5: morula, 6 et 7 : blastocyste, 8: cellules ES) (adapté de Wang *et al.*, 2003) (B) Localisation du transcrit par hybridation *in situ* (adapté de Chambers *et al.*, 2003) (C) Expression de Nanog en « poivre et sel » dans la MCI, par hybridation *in situ* (image de gauche) et immunomarquage (images de droite) (adapté de Chazaud *et al.*, 2006a)



**Fig.8** : Expression préimplantatoire de Gata6 et Gata4.

(A) Expression de la protéine (gauche) et du transcrit (droite) en poivre et sel, les flèches indiquent les cellules n'exprimant pas Gata6 (Chazaud *et al.*, 2006a). (B) Expression de la protéine Gata4 (les chiffres donnés correspondent au nombre total de cellules de l'embryon (Plusa *et al.*, 2008)

## IC-2 Les acteurs moléculaires de la détermination Epr vs Epi

On sait que avant la mise en place de l'Epr et de l'Epi, ces cellules sont prédéterminées. On connaît maintenant différents gènes et voies de signalisation jouant un rôle dans cette différenciation, même si les mécanismes et interactions exactes sont loin d'être totalement élucidées.

Nanog est un facteur de transcription à homéodomaine identifié simultanément par deux équipes différentes. Les deux montrent que Nanog joue un rôle important dans le maintien de la pluripotence des cellules ES et lui donnent ce nom basé sur la mythologie celtique du pays de la jeunesse éternelle « Tir nan Og » (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). *In vivo*, ils le décrivent comme un marqueur précoce de l'ICM. En effet, l'ARNm est détecté *in situ* dans les cellules internes des morulas compactées et dans la MCI de blastocystes à E3.5 à E4.0 (fig.7b). Un autre groupe montre par RT-PCR que ce facteur de transcription est exprimé dès le stade 2 cellules (fig.7a) (Wang et al., 2003). De plus, l'expression de *Nanog* dans la MCI à E3.5 est restreinte qu'à une partie des cellules (fig.7c, « poivre et sel ») (Chazaud et al., 2006) avant d'être restreinte à l'Epi seul et perdue à l'implantation (Chambers et al., 2003). L'inactivation de *Nanog* dans les cellules ES entraîne leur différenciation (Mitsui et al., 2003). *In vivo* les mutants meurent après implantation. A E3.5, ils présentent une morphologie normale, mais en culture, la MCI ne prolifère pas, en accord avec l'absence d'Epi et d'endoderme extra-embryonnaire dans les embryons *Nanog*<sup>-/-</sup> à E5.5 (Mitsui et al., 2003). L'analyse récente des mutants *Nanog*<sup>-/-</sup> a montré que ces embryons présentent une MCI plus petite, avec un Epi apparemment mal-différencié et l'absence d'EPr (Silva et al., 2009). La MCI de ces mutants semble bloquée avant leur spécification. En effet, ils ont observé quelques rares cellules co-exprimant Oct4 et la cytokératine 8 au sein de la MCI (Silva et al., 2009).

Deux facteurs GATA ont été caractérisés comme marqueurs de l'EPr *in vivo* et *in vitro* : *Gata4* et *Gata6*. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription à doigts de zinc. Dans l'embryon à E4.5 ils sont exprimés exclusivement dans l'EPr (fig.8) (Arceci et al., 1993; Cai and Gudas, 2009; Chazaud et al., 2006; Koutsourakis et al., 1999; Morrissey et al., 1998). Avant et après, l'expression des deux facteurs diffère. En effet, *Gata6* est co-exprimé avec *Nanog* dans toutes les cellules de la morula aux stades 8 et 16 cellules et jusqu'au stade de



blastocyste précoce où quelques cellules de la MCI peuvent encore les co-exprimer (Plusa et al., 2008). Ensuite, son expression est progressivement restreinte à une partie des cellules de la MCI à E3.5 selon un motif en « poivre et sel » (Chazaud et al., 2006). Il doit donc exister un mécanisme qui permet de passer de la co-expression de *Gata6* et *Nanog* à leur restriction exclusive à deux types cellulaires différents. L'expression de *Gata4* est induite plus tardivement, également dans la MCI (fig.8b) (Plusa et al., 2008) et dans les cellules *Gata6* positives (Claire Chazaud, données non publiées). Par la suite, l'expression de *Gata6* devient spécifique de l'endoderme pariétal (EP) et *Gata4* de l'EP et de l'endoderme viscéral (VE) (Cai and Gudas, 2009). Différentes équipes se sont intéressées aux mutants *Gata6*<sup>-/-</sup>, ils montrent qu'il y a une létalité postimplantatoire due à des défauts dans la différenciation des dérivées de l'EPr (Koutsourakis et al., 1999; Morrissey et al., 1998). Plus récemment une autre équipe a détecté un phénotype plus précoce, montrant une absence d'EPr dans les embryons *Gata6*<sup>-/-</sup> à E4.5 (Cai and Gudas, 2009). *Gata6* joue donc un rôle important dans la différenciation de l'EPr *in vivo*. La différence entre les phénotypes observés dans ces trois études est certainement due à un problème de génotypage. Il est donc possible, qu'un phénotype plus précoce existe sans avoir été détecté. Il serait intéressant d'étudier le phénotype de ces mutants plus tôt, entre E2.5, E3.5 et E4.5 pour élucider le rôle de *Gata6* dans la détermination des cellules endodermiques et la mise en place de l'épithélium. Les embryons *Gata4*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de défaut précoce dans la formation de l'EPr (Kuo et al., 1997). En revanche, ces mutants présentent des défauts cardiaques précoces et une mauvaise fermeture du sac vitellin témoignant de la perturbation du rôle inducteur du VE, un dérivé de l'EPr (Kuo et al., 1997). Les doubles hétérozygotes *Gata4*<sup>+/-</sup>/*Gata6*<sup>+/-</sup> sont létaux vers E13.5 (Xin et al., 2006). Ceci témoigne d'une redondance fonctionnelle entre ces deux facteurs.

De façon intéressante, dans les cellules F9 mutantes pour *Sox7*, l'expression de *Gata6* et *Gata4* est perdue lors de leur différenciation en EPr, plaçant ce facteur en amont des deux gènes *Gata* dans ce modèle cellulaire (Futaki et al., 2004).

Les travaux *in vitro* ont apporté des arguments forts soutenant le rôle de *Gata6* et *Gata4* dans la différenciation de l'EPr. En effet, ils sont induits lors de la différenciation de cellules ES en EPr par l'acide rétinoïque et leur surexpression dans les cellules ES est suffisante pour induire cette même différenciation (Capo-Chichi et al., 2005; Fujikura et al., 2002; Shimamoto et al., 2007). Dans les corps embryonnaires (CE) obtenus par agrégation de cellules ES en suspension, les cellules externes forment l'EPr et ses dérivés (VE) et expriment *Gata4* et *Gata6* (Bielinska and Wilson, 1997; Fujikura et al., 2002; Soudais et al., 1995).



L'invalidation de *Gata6* ou *Gata4* empêche la différenciation des cellules ES en EPr (Bielinska and Wilson, 1997; Capo-Chichi et al., 2005; Soudais et al., 1995). L'addition en culture d'AR peut sauver le phénotype des cellules *Gata4*<sup>-/-</sup>, avec l'expression de Dab2 et *Gata6* (Bielinska and Wilson, 1997; Capo-Chichi et al., 2005). En revanche, ce sauvetage est impossible pour les cellules mutantes *Gata6*<sup>-/-</sup> (Capo-Chichi et al., 2005). *Gata6* comme *Gata4* sont des marqueurs de l'EPr, impliqués dans sa différenciation. Les résultats *in vivo* et *in vitro* montrent, par les expériences d'invalidation génique et les marquages, que *Gata6* se situe en aval de *Gata4* dans la cascade d'induction de l'EPr par l'AR. L'AR peut induire, probablement directement, l'expression de *Gata6 in vitro* et par là, la différenciation en EPr. En revanche, *Gata4* ne semble pas être requis dans cette cascade de différenciation par l'AR.

Le gène *Grb2* (**G**rowth factor **R**eceptor-**B**ound protein **2**) code pour une protéine adaptatrice de la voie de signalisation des RTK (**R**écepteurs **T**yrosine **K**inase) tels que les récepteurs aux FGF. GRB2 est requise pour la transduction du signal vers les voies RAS (**R**at **S**arcoma virus oncogène), RAF (**R**af-leukemia viral oncogène) et MAPK (**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inase). Les cellules ES inactivées pour le gène codant pour la protéine de liaison RAS ne forment plus d'EPr *in vitro* (Hamazaki et al., 2006; Yoshida-Koide et al., 2004). Il a été montré que les mutants *Grb2*<sup>-/-</sup> sont incapables de former les dérivés de l'EPr *in vitro* (Cheng et al., 1998). La réexamination de ces mutants montre la perte de l'expression de *Gata6* dans les mutants *Grb2* qui ne forment plus d'EPr. L'absence de *Gata6* est accompagnée de l'expression ectopique de *Nanog* dans la MCI, indiquant que toutes les cellules ont pris un destin épiblastique (Chazaud et al., 2006). La voie des RTK et la protéine *Grb2* sont donc requis pour la différenciation de l'EPr en amont de *Gata6* (Chazaud et al., 2006). Les principaux acteurs qui agissent dans cette voie pour l'induction du lignage endodermique semblent appartenir à la signalisation FGF. Il a été montré que l'invalidation de *Fgf4* ou des récepteurs *FgfR1*, *FgfR2* présentent des phénotypes semblables aux embryons *Grb2*<sup>-/-</sup> *in vivo* (Arman et al., 1998; Esner et al., 2002; Feldman et al., 1995). Le blocage de la signalisation via *Fgfr2* par introduction d'un dominant-négatif diminue la transcription de gènes endoderme-spécifiques comme *Gata6*, *Sox17* et *Foxa2* (Meszaros et al., 2007). De plus, l'absence de *Fgf4* empêche la formation d'EPr à la surface des CE et comme pour *Gata4*, ce phénotype est sauvé par l'addition d'AR en culture (Wilder et al., 1997). L'expression des transcrits et protéines de *Fgf4* est localisée au niveau de la MCI et de l'Epi (Niswander and Martin, 1992; Rappolee and Werb, 1990). Des travaux très récents confortent le rôle des FGF dans la ségrégation entre EPr et Epi. L'inhibition de la voie FGF/MAPK *in vivo* phénocopie



les mutants *Grb2*<sup>-/-</sup> et induit l'identité épiblastique alors qu'une hausse de la signalisation via cette voie promeut la différenciation en EPr (Nichols et al., 2009; Yamanaka et al., 2010). D'une façon intéressante, l'inhibition et l'activation de la voie FGF/MAPK sur les embryons en culture montre que les cellules pré-Epi et pré-EPr peuvent changer d'identité jusqu'à E4.0 (Yamanaka et al., 2010). En effet, l'inhibition de la voie à partir de E3.5 induit encore l'expression ectopique de Nanog dans la MCI et de même pour l'activation tardive de cette voie qui conduit à une expression de Gata6 dans toutes les cellules de la MCI (Yamanaka et al., 2010). Le traitement d'embryons par la combinaison d'inhibiteurs de ERK et GSK3β, 2i/3i (Ying et al., 2008), favorise également la différenciation exclusive d'Epi à partir de la MCI, identifié par un marquage fort de Nanog à E4.5 (Nichols *et al.*, 2009). En revanche, dans ces expériences, l'induction ectopique de Nanog par le 2i/3i n'est pas réversible comme cela a été observé par Yamanaka *et al.* (Nichols et al., 2009). Cette différence est sûrement la conséquence de l'inhibition plus longue dans le cas du 2i/3i. En effet, dans ce cas, les inhibiteurs ne sont enlevés qu'après 2 jours de culture, donc un équivalent E4.5 (Nichols et al., 2009). Yamanaka et al. n'observent une réversibilité que jusqu'à E4.0 (Yamanaka et al., 2010). Mais les FGFs semblent ne pas être les seuls RTK à jouer un rôle dans la différenciation de l'EPr. Deux études par microarray identifient *Pdgfra* (**P**lateled **d**erived **g**rowth **f**actor **r**eceptor **α**) comme un marqueur potentiel de l'EPr (Gerbe et al., 2008; Kurimoto et al., 2006). Les Pdgfr activent la voie de la PI3K et peuvent jouer un rôle entre autres dans les mouvements cellulaires et l'inhibition de l'apoptose. Récemment, il a été montré que celui-ci, est en effet exprimé dans l'EPr et ses précurseurs et ses dérivés (Plusa et al., 2008). Le suivi des cellules *Pdgfra*<sup>H2B-GFP/+</sup> exprimant la GFP nucléaire au locus de *Pdgfra* montre que de mécanismes complexes combinant mouvements cellulaires et informations positionnelles dirigent la ségrégation entre l'Epi et l'EPr en plus de l'expression des marqueurs spécifiques, Nanog et Gata6 (Plusa et al., 2008). Il s'agit ici d'un « gene trap » et non pas d'un ciblage par recombinaison homologue. De plus d'autres études montrent que *Pdgfra* n'est pas spécifique des cellules endodermiques, mais exprimé plus largement dans l'embryon (Morris et al., 2010; Yamanaka et al., 2010).

Comment se fait alors le passage d'un pool de cellules co-exprimant Gata6 et Nanog à une MCI avec deux populations de cellules pré-Epi et pré-EPr exprimant exclusivement Nanog ou Gata6 ? L'exclusion est progressive, car dans les blastocystes, les cellules co-exprimant Gata6 et Nanog deviennent petit à petit moins nombreuses. Il doit exister une inhibition mutuelle entre ces deux marqueurs permettant la spécification de précurseurs





exprimant ou l'un, ou l'autre gène. Le ou les mécanismes impliqués dans cette répression restent à être définis. Les différentes études sur la voie des RTK montrent qu'elle joue un rôle important à ce niveau, car son inhibition conduit à la promotion de l'identité épiblastique et inversement, son activation va promouvoir l'identité endodermique.

### IC-3 La ségrégation EPr vs Epi

A E3.5, la MCI est donc composée d'un mélange de cellules pré-Epi et pré-EPr qui forment, un jour plus tard, deux tissus distincts. Ce changement implique un tri cellulaire et l'épithélialisation des cellules endodermiques. Le tri cellulaire pourrait se faire de manière active ou passive, ou les deux, en combinant migration active, différences d'adhésion et le repositionnement des cellules filles après une mitose. Les études majoritairement *in vitro* sur la formation de CE ont permis d'identifier des acteurs impliqués dans ces mécanismes.

La Maspine est une protéine jouant un rôle dans la migration cellulaire. Elle est exprimée dans les dérivés de l'Epr. Les mutants *Maspine*<sup>-/-</sup> meurent à l'implantation d'un défaut de croissance général dû à l'absence d'une couche de VE normale (Gao et al., 2004). La mise en culture de ces embryons met en évidence des problèmes de prolifération et de différenciation de cellules de la MCI avec l'absence de cellules endodermiques et un marquage plus rare de Gata4 (Gao et al., 2004). *In vitro*, la formation de corps embryoïdes (CE) à partir de cellules ES *Maspine*<sup>-/-</sup> conduit à des CE plus petits et désorganisés (Gao et al., 2004). Les cellules de VE, formant un épithélium externe dans les CE sauvages, sont réparties en « poivre et sel » dans les CE mutants.

On observe des phénotypes similaires pour le gène codant Dab2, une protéine adaptatrice intracellulaire. Elle est impliquée dans l'endocytose où elle peut s'associer à des clathrines des cargos endocytiques et en parallèle lier la protéine moteur Myosine VI (Inoue et al., 2002; Mishra et al., 2001; Morris et al., 2002a). Elle est également capable de se lier à des protéines transmembranaires, passagères des cargos endocytiques, telles que les LRP et les intégrines. Dab2 est un marqueur spécifique, tardif, de l'Epr. Il est exprimé à E4.5 dans l'épithélium fonctionnel (Yang et al., 2002). Dab2 est détecté au plus tôt à E3,75 dans quelques cellules endodermiques isolées ayant déjà atteint la surface de la MCI. Cette expression est polarisée, la protéine est localisée au pôle apical de ces cellules comme dans



l'EPr (Gerbe et al., 2008). Deux phénotypes mutants ont été observés. Une première équipe montre qu'en absence de Dab2 les embryons meurent pendant l'implantation, incapables de maintenir l'Epi et de gastruler (Morris et al., 2002b). Une deuxième, observe un phénotype plus précoce avec un défaut de localisation des cellules de l'Epr à l'intérieur de l'Epi (Yang et al., 2002). *In vitro*, ces résultats sont confirmés par les expériences sur corps embryonnaires. Les cellules mutantes perdent l'expression de gènes de la polarité épithéliale et sont mal localisées, à l'intérieur des corps embryonnaires au lieu d'être à la surface (Rula et al., 2007; Yang et al., 2007).

Dab2 est donc un gène requis dans le positionnement correct des cellules endodermiques et dans leur migration. Le rôle de Dab2 dans la mise en place de l'EPr peut passer par l'adhésion cellulaire grâce à l'interaction de Dab2 avec des molécules comme l'intégrine  $\beta 1$ , mais également par son effet sur la polarisation des cellules en interagissant avec les réseaux microtubulaires permettant la migration des cellules. L'inactivation de l'intégrine  $\beta 1$  conduit à une létalité péri-implantatoire *in vivo* (Fassler and Meyer, 1995; Fassler et al., 1995; Stephens et al., 1993; Stephens et al., 1995). La mise en culture des embryons mutants pour l'intégrine  $\beta 1$  montre qu'il y a des défauts dans la croissance et la différenciation des cellules endodermiques à partir de la MCI proche de ce qui a été observé pour Fgf4 (Stephens et al., 1995).

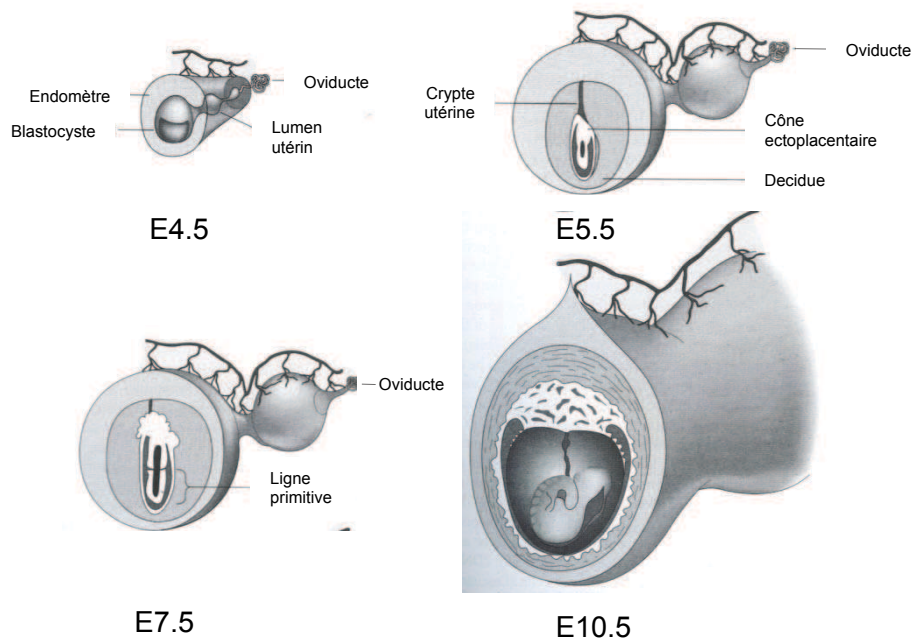
Des expériences de vidéomicroscopie *in vivo* montrent que les mouvements cellulaires majoritaires dans la MCI seraient actine-dépendants et donc actifs (Meilhac et al., 2009). Ils pourraient être impliqués dans la ségrégation entre cellules pré-Epi et pré-EPr, mais les mouvements décrits dans l'étude ne semblent pas très évidents. Dans une autre étude, l'expression de la H2B-GFP sous contrôle d'un marqueur de l'EPr en combinaison avec la vidéomicroscopie a permis de mettre en évidence un mouvement des cellules pré-EPr vers l'interface avec la cavité blastocœlique (Plusa et al., 2008). *In vitro*, les cellules ES invalidées pour l'E-cadhérine, ayant une force adhésion cellulaire faible, sont capables d'un tri permettant de former une couche d'EPr à la surface de CE (Moore et al., 2009) suggérant que dans le cas de la ségrégation Epi/EPr, ce l'E-Cadhérine ne jouerait pas un rôle primordial.

La formation de l'EPr implique non seulement la migration des cellules vers leur localisation finale, mais également la mise en place d'un épithélium fonctionnel. L'importance de Dab2 est clairement établie dans l'embryon et les cellules ES par l'absence de la mise en place de l'EPr. A partir d'un microarray *Lrp2* (low density lipoprotein receptor

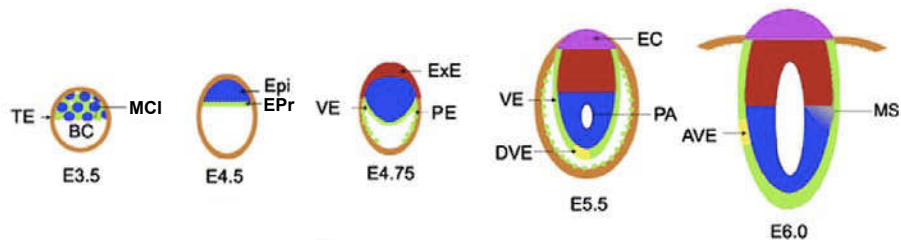


bound protein 2), aussi appelée *Megaline*, a été identifié comme un gène potentiellement impliqué dans la différenciation de l'EPr (Gerbe et al., 2008). Son expression est spécifique de l'EPr à E4.5, avec d'autres protéines de la même voie comme Lrpap1, Amnionless et Cubiline. De façon intéressante, la protéine est localisée au pôle apical des cellules épithéliales comme l'est Dab2. A E3.5, Lrp2 est exprimé dans le TE (Gerbe et al., 2008; Gueth-Hallonet et al., 1994) et dans une partie des cellules de la MCI, en « poivre et sel » (Gerbe et al., 2008). Le nombre de cellules exprimant Lrp2 augmente progressivement. Ces cellules n'expriment pas Nanog, ce qui témoigne d'un rôle dans la mise en place, dans la maturation de l'EPr (Gerbe et al., 2008). Il est important de noter que les cellules Lrp2 vont progressivement acquérir des caractéristiques épithéliales. En effet, à E3.75, certaines commencent à exprimer le Collagène-IV, requis pour la production de la lame basale (Gerbe et al., 2008). Les cellules en surface se polarisent individuellement, il y a colocalisation de Lrp2 et Dab2 au pôle apical (Gerbe et al., 2008). Ceci est en accord avec les données *in vitro* où Lrp2 est recruté par Dab2 dans les CE (Yang et al., 2007). De plus, dans les cellules ES *Dab2*<sup>-/-</sup> la localisation apicale de Lrp2 est perdue (Yang et al., 2007).

Si il est clair que la MCI est composée de deux populations de précurseurs de, l'Epi et de l'EPr, comme le montrent les nombreuses expériences décrites auparavant, les mécanismes de tri cellulaire pour arriver à deux tissus distincts sont beaucoup moins élucidés. On peut suggérer l'existence de mouvements cellulaires passifs dus aux différences d'adhésion cellulaire comme l'indiquent certains mutants de molécules d'adhésion (Gao et al., 2004; Stephens et al., 1995), controversé par d'autres (Moore et al., 2009). Des phénomènes de migration active actine-dépendants ont également été proposés (Meilhac et al., 2009). Il est probable que la différenciation et la ségrégation de l'EPr se font par l'acquisition progressive de molécules d'adhésion cellulaire et de l'endocytose participant à leurs déplacements et leur polarisation. Une fois à la surface, les cellules précurseurs de l'EPr se polarisent une à une pour former progressivement un épithélium fonctionnel (fig.6) (Gerbe et al., 2008).



**Fig.9** : Schéma du début du développement postimplantatoire, avec embryons *in situ* (traduit de Nagy *et al.*, 2003)



**Fig.10** : Schéma des différenciations cellulaires *in vivo* entre les stades E3.5 et E6.0 (Gerbe *et al.*, 2008); légende : TE = trophoblaste, orange ; BC = blastocoele, cavité blastocœlique ; MCI = masse cellulaire interne ; Epi = épiblaste, bleu ; EPr = endoderme primitif, vert ; VE = endoderme viscéral, vert ; PE = endoderme pariétal, vert ; DVE = VE distal, jaune ; ExE = ectoderme extraembryonnaire, rouge ; AVE = VE antérieur, jaune ; EC = cône ectoplacentaire, rose ; PA = cavité proamniotique ; MS = mésendoderme

## ***ID Implantation et devenir de l'EPr***

A E4.5, l'embryon composé des trois tissus distincts : TE, Epi et EPr, va s'implanter dans la paroi utérine. Pour cela, il doit tout d'abord éclore de sa zone pellucide. L'éclosion se fait indépendamment de l'environnement utérin. Elle peut avoir lieu in vitro et se fait grâce à la libération de protéases par les cellules du TE mural. Ensuite, l'embryon va adhérer à la paroi utérine du côté ante-mésentéral par son extrémité abembryonnaire, au plus loin de l'Epi. Cette adhésion va engendrer la formation d'une crypte utérine et la réaction déciduale sous influence de progestérone et oestrogènes. L'embryon va continuer son développement au sein de la décidue (fig.9) (Bielinska et al., 1999; Nagy et al., 2003).

Après l'implantation, l'Epi continue à proliférer et va progressivement envahir la cavité blastocœlique. Il est entouré par une monocouche de cellules dérivées de l'EPr : l'endoderme viscéral (VE). Les cellules de l'endoderme pariétal (PE), dérivant également de l'EPr, vont migrer le long du TE mural et sécréter avec ce dernier différentes molécules comme le collagène IV et des laminines afin de former une membrane basale dite « de Reichert » (fig.10). L'ensemble du VE et du mésoderme extraembryonnaire constitue le sac vitellin. Ce dernier est indispensable pour les premiers échanges nutritionnels avec la mère, avant la mise en place du placenta (Bielinska et al., 1999).

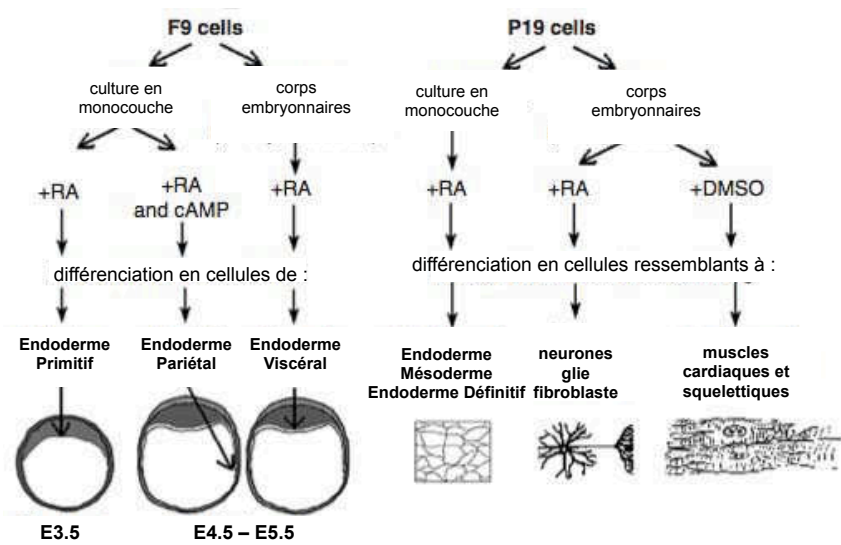
Mais ce n'est pas le seul rôle des dérivés de l'EPr. Le VE est requis précocement, avant la gastrulation, dans la mise en place d'axes embryonnaires. En effet, un premier axe, proximo-distal (P-D) est défini par une zone distale du VE, le VE distal ou DVE. Cette région se distingue morphologiquement par un épaississement des cellules (Rivera-Perez et al., 2003) et l'expression de gènes tels que *Hex*, *Cerberus-like (Cerl)* et *Lefty1* (Ang and Constam, 2004). Il a été montré que cette région migre activement en antérieur (Srinivas et al., 2004), on parle alors du VE antérieur ou AVE. L'AVE est caractérisé par l'expression d'inhibiteurs de voies de signalisation impliquées dans les structures postérieures comme WNT (Dkk1), BMP (Cerl), et TGF $\beta$  (Lefty)1 (Ang and Constam, 2004). Il spécifie ainsi l'axe A-P en bloquant les signaux postérieurs (Kimura et al., 2000; Perea-Gomez et al., 2001). Enfin, la migration, la mise en place et le maintien de l'AVE sont orchestré par de nombreuses interactions avec les tissus adjacents (Ang and Constam, 2004; Rossant and Tam, 2009).

Plus tôt, à l'implantation, une asymétrie a déjà été observée pour certains gènes comme *Hex* et *Pem* exprimés asymétriquement dans l'EPr à E4.5 (Chazaud and Rossant, 2006). La  $\beta$ -





caténine nucléaire est retrouvée dans un trophoblaste unique faisant face à l'EPr (Chazaud and Rossant, 2006). *Lefty1* a également été proposé comme asymétriquement exprimé dans l'EPr (Takaoka et al., 2006). Cette expression est controversée puisque d'autres ont montré que *Lft1* est exprimé centralement ou symétriquement dans l'EPr (Chazaud and Rossant, 2006; Mesnard et al., 2006; Torres-Padilla et al., 2007b). Cer1 (Cerberus) a également été proposé comme marqueur d'une asymétrie précoce. Le groupe de M. Zernicka-Goetz montre que les cellules exprimant Cer1 (Cerberus) auraient tendance à être localisées de façon asymétrique dans les embryon dès l'implantation (Torres-Padilla et al., 2007b).



**Fig.11** : Possibilités de différenciation de cellules EC *in vitro*, effet de l'acide rétinoïque en culture et tissus équivalents *in vivo* (adapté et traduit de Soprano *et al.*, 2007)

## ***IE Les cellules souches dérivés du blastocyste***

### **IE-1 Les cellules de carcinome embryonnaire**

(fig.11) (Andrews, 2002; Yu and Thomson, 2008)

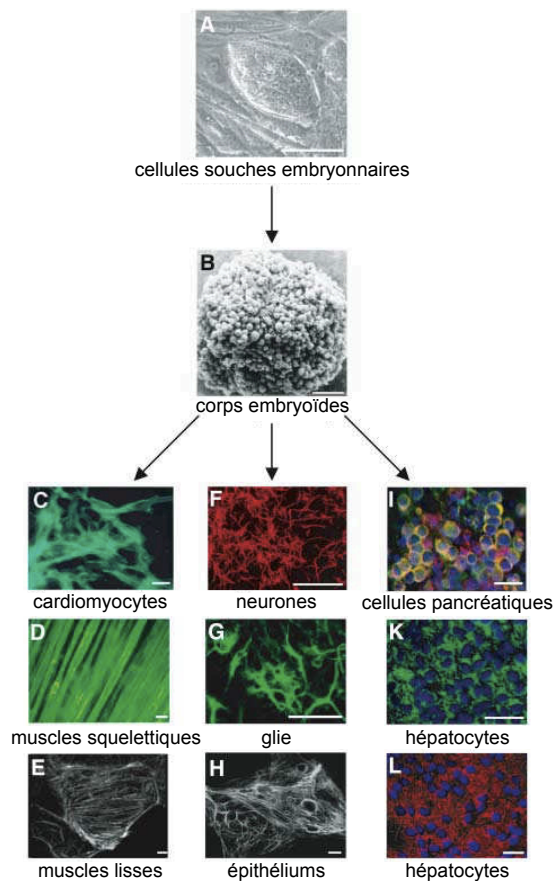
L'origine des cellules de carcinome embryonnaire (cellules EC) remonte aux années 50 avec l'observation de teratocarcinomes *in vivo* et plus particulièrement au niveau des testicules de souris. Ces carcinomes sont composés des trois lignées embryonnaires (ecto-, endo- et mésoderme) et d'une population de cellules indifférenciées (Kleinsmith and Pierce, 1964). Dix à vingt années plus tard, les premières lignées de cellules EC ont pu être dérivées (Evans, 1972). Les études et caractérisations qui ont suivi sur ces lignées les ont qualifiées de « caricatures *in vitro* du développement ». La découverte de gènes exprimés en commun entre les cellules EC et les cellules pluripotentes de la MCI comme Oct4 ont permis de tracer des parallèles avec l'embryon (Artzt et al., 1973; Yeom et al., 1996). Quelques lignées de cellules EC peuvent participer à la majorité des tissus dans la formation de souris chimères, mais une transmission germinale est extrêmement rare.

Aujourd'hui, deux lignées de cellules EC sont principalement utilisées : les cellules P19 et les cellules F9. Elles diffèrent entre autres par leur potentiel de différenciation, par addition d'acide rétinoïque ou DMSO dans la culture, les P19 se différencient en tissus embryonnaires : en neur ectoderme ou mésoderme respectivement et en endoderme définitif. Les cellules F9 se différencient en EPr et VE dérivés par addition d'AR et en PE en combinant AR et AMPc ce qui en fait un outil de travail très intéressant pour notre équipe.

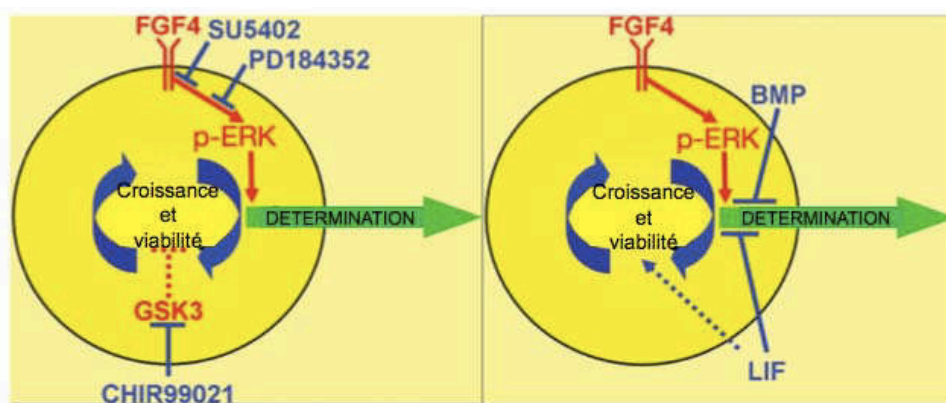
### **IE-2 Les cellules souches embryonnaires**

(Andrews, 2002; Chambers and Smith, 2004; Yu and Thomson, 2008)

Les premières lignées ont été isolées il y a 30 ans à partir de blastocystes de trois jours et demi en utilisant les conditions de culture des cellules EC : co-culture avec des fibroblastes comme cellules nourricières et du sérum (Brook and Gardner, 1997; Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). La grande valeur de ces cellules vient du fait qu'elles peuvent participer aux trois feuillets embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme, par différenciation



**Fig.12** : Potentiel de différenciation des cellules ES *in vitro* (traduit de Wobus et Boheler, 2005)



**Fig.13** : Schématisation de l'autorenouvellement et le maintien de la pluripotence de cellules ES par a) des inhibiteurs en amont de phospho-ERK et l'inhibition de la GSK3 ou b) par l'action de LIF et BMP en aval des voies de signalisation (traduit de Ying *et al.*, 2008)

*in vitro* ou *in vivo* après réinjection dans un blastocyste (fig.12) (Beddington and Robertson, 1989). Il faut néanmoins préciser que les cellules ES ne participent que très exceptionnellement aux tissus extraembryonnaires et ne peuvent donc être considérées comme totipotentes. Les cellules ES peuvent coloniser la lignée germinale de chimères et transmettre leur patrimoine génétique à la génération suivante. Cette caractéristique est aujourd'hui largement utilisée dans l'établissement de lignées de souris transgéniques pour étudier les fonctions de gènes donnés.

Depuis leur isolement, nombreuses équipes ont cherché à adapter les milieux de cultures afin de s'affranchir de l'utilisation des cellules nourricières et du sérum et afin de caractériser les molécules impliquées dans le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement en culture de ces cellules. Le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) fait partie de la famille des Interleukine-6 (Il-6) et a été le premier facteur identifié dans le maintien des cellules ES *in vitro* par fractionnement du milieu de culture conditionné (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Il est sécrété par les fibroblastes et agit via le complexe de récepteur de LIF (LIFR) et gp130 pour activer les voies de signalisation JAK/STAT, via STAT3 (Yoshida et al., 1994; Yu and Thomson, 2008), et ERK/MAPK (Takahashi-Tezuka et al., 1998; Yu and Thomson, 2008). *In vivo*, en revanche, ni LIF, ni gp130 ou STAT3 ne sont requis avant la gastrulation (Takeda et al., 1997; Ware et al., 1995; Yoshida et al., 1996; Yu and Thomson, 2008) indiquant que l'embryon utilise d'autres voies de signalisation dans le maintien de la pluripotence de l'Epi. L'addition de BMP4 en plus de LIF bloque la différenciation des cellules en absence des cellules nourricières et de sérum. De même, la combinaison d'un inhibiteur spécifique de la GSK3 $\beta$ , le BIO (6-bromoindirubin-3'-oxim), permet en combinaison avec le LIF la génération de cellules ES sans sérum ou « feeder » (Sato et al., 2009). Récemment, d'autres travaux ont permis le maintien des cellules ES en culture à l'aide d'inhibiteurs spécifiques des voies Wnt et phospho-ERK sans LIF ni BMP (fig.13) (Ying et al., 2008).

### **IE-3 Les cellules souches épiblastiques**

Récemment, un nouveau type de cellules pluripotentes a été isolé à partir de l'épiblaste d'embryons postimplantatoires à E5.75 : les cellules souches épiblastiques ou EpiSC (Brons et al., 2009 ; Tesar et al., 2009). Ces cellules ressemblent beaucoup aux cellules souches



embryonnaires humaines (hES) et diffèrent en nombreux points des cellules souches embryonnaires murines dérivées de la MCI d'un blastocyste. En effet, leur dérivation ne peut se faire dans un milieu conditionné pour cellules ES murines (LIF/BMP), mais devient possible dans le milieu conditionné utilisé pour la culture des cellules hES (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). En effet, leur isolement et maintien nécessitent la présence d'activine A car son inhibition entraîne leur différenciation (Brons et al., 2007). Le maintien des cellules ES humaines requiert également FGF, dans les EpiSC murines il est dispensable, mais semble améliorer la qualité générale de la culture (Brons et al., 2007). Comme c'est le cas pour les cellules ES de souris, les EpiSC expriment des facteurs de pluripotence tels que Oct4, Nanog et Sox2 en revanche elle n'expriment pas Rex1 et ne présentent pas d'activité alcaline phosphatase (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Ces cellules sont incapables de coloniser un embryon dans les expériences de chimérisme, mais forment des tératocarcinomes avec nombreuses cellules différenciées (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Enfin, les EpiSC sont des cellules souches pluripotentes avec un large spectre de différenciation in vitro où elles peuvent donner les différents types cellulaires embryonnaires mais également des cellules de l'EPr et du TE par l'action de BMP4 (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007).

#### **IE-4 Les cellules souches extraembryonnaires**

##### *IE-3 a) Les cellules souches trophoblastiques*

Les cellules souches trophoblastiques ou cellules TS pour « Trophoblast Stem cells » peuvent être dérivées de l'ectoderme extraembryonnaire avant la gastrulation ou bien du TE de blastocystes à E3.5. Elles ont été isolées pour la première fois il y a une dizaine d'années grâce à un milieu conditionné par des fibroblastes primaires murins : EMFI-CM additionné de FGF4 et d'héparine (Tanaka et al., 1998). Leur contribution dans les chimères est limitée aux dérivés du TE. Elles expriment des marqueurs trophoblastiques comme Cdx2 et Eomes (Tanaka et al., 1998). L'absence de FGF4 dans la culture provoque la différenciation des cellules TS. Elles prennent un aspect de cellules géantes et la transcription de gènes tels que Mash2, spécifique du cône ectoplacentaire, et Pl-1, un marqueur des cellules géantes, est induite (Tanaka et al., 1998).





### *IE-3 b) Les cellules souches d'endoderme extraembryonnaire*

Les cellules XEN pour « eXtraembryonic ENdoderm » ont été isolées récemment (Kunath et al., 2005). Trois différents protocoles sont décrits, mais la procédure la plus efficace semblerait être la mise en culture de MCI selon les conditions requises pour les cellules TS (EMFI-CM, Embryonic Fibroblast Conditioned Medium).

Ces cellules sont capables d'autorenouvellement sans apparition d'anormalités phénotypiques et participent aux dérivés de l'EPr dans les expériences de chimères. De plus, elles expriment différents marqueurs en commun avec l'EPr tels que *Gata4*, *Gata6*, *Dab2* et *Pdgfra* présentant ainsi un modèle adéquat dans l'étude de la différenciation de l'EPr (Kunath et al., 2005). Le retrait du milieu conditionné va entraîner la différenciation avec d'importants changements morphologiques. Cette différenciation induit la diminution de *Sox7* et *Gata4* et induit la transcription de *Afp* ce qui les rapproche des cellules du VE embryonnaire. Elles augmentent fortement de volume et présentent des vacuoles et leur propagation devient impossible (Kunath et al., 2005). Dans les expériences de chimérisme, les cellules XEN introduites dans un blastocyste peuvent participer aux dérivés de l'EPr. Elles vont avoir une très forte tendance à coloniser le PE plutôt que le VE probablement à cause d'un biais expérimental (Kunath et al., 2005). Les cellules XEN indifférenciées présentent une curiosité morphologique. Elles peuvent prendre une forme arrondie ou épithéliale avec une plasticité entre ces deux sans passer par une division cellulaire (Kunath et al., 2005).

### **IE-5 les cellules souches et biologie du développement**

Grâce à leurs similarités avec les cellules de l'Epi, les cellules ES sont couramment utilisées comme modèle in vitro du développement précoce. Elles présentent de nombreux avantages par rapport aux embryons. Un très bon exemple sont les corps embryonnaires (CE). Il s'agit de cellules ES cultivées en suspension et formant des agrégats en absence de LIF. Les CE sont un outil précieux car elles récapitulent les différentes étapes du développement précoce. En effet, elles sont capables de former tous les types cellulaires : des tissus extraembryonnaires comme l'EPr et ses dérivés et les tissus embryonnaires, c'est-à-dire les 3 feuillets embryonnaires, ectoderme, mésoderme et endoderme (Desbaillets et al., 2000; Wobus and Boheler, 2005). Leur capacité à se différencier en tissus extraembryonnaires dans



les CE est surprenante, car dans les chimères elles ne vont coloniser que les tissus embryonnaires mettant en avant la différence entre l'environnement *in vivo* et *in vitro*.

Depuis leur isolement, les cellules souches ont permis de faire d'importantes avancées dans la compréhension du caractère de pluripotence. La comparaison entre différents types de cellules souches au niveau transcriptomique a amené la caractérisation moléculaire des ces cellules, par exemple entre les cellules ES et les cellules XEN (Kunath et al., 2005) ou les cellules ES et TS (Tanaka et al., 2002). Ces travaux ont ainsi apporté une contribution importante à la compréhension du rôle et des interactions de facteurs clés impliqués dans les premières déterminations cellulaires tels que *Cdx2* (Niwa et al., 2005), *Oct4* (Niwa et al., 2000), *Nanog* (Mitsui et al., 2003) et les facteurs *Gata4* et *Gata6* (Fujikura et al., 2002).

Grâce aux parallèles établis entre Epi et cellules ES, entre TE et cellules TS et enfin entre EPr et cellules XEN, de nouveaux marqueurs EPr spécifiques ont pu être identifiés et étudiés. En effet *Lrp2*, décrit auparavant, a été identifié et sélectionné comme un marqueur de l'EPr grâce à un microarray réalisé sur les embryons et les cellules ES, TS et XEN en sélectionnant les gènes induits aux stades E3.5 et E4.5 et absents des cellules ES et TS (Gerbe et al., 2008).

De plus, des expériences récentes d'immunoprécipitations de la chromatine sur les cellules ES ont apporté une vision plus claire des interactions facteur de transcription/gènes cibles. Il a pu être montré que *Oct4*, *Nanog* et *Sox2* coopèrent dans la régulation de nombreuses cibles et dans une boucle auto-régulatrice participant ainsi dans la maintien de la pluripotence des cellules ES (Boyer et al., 2005; Masui et al., 2008; Pan and Thomson, 2007).

Malgré toutes ces informations obtenues grâce aux cellules souches, il faut toujours garder à l'esprit qu'il s'agit d'un modèle *in vitro*. Ceci implique que les cellules sont sorties de leur contexte physiologique, perdant ainsi les interactions avec d'autres tissus et l'apport éventuel de facteurs exogènes absents en culture. On ne peut d'ailleurs connaître tous les changements que ces cellules subissent à leur isolement comme par exemple des changements dans les marques épigénétiques. La différence entre une cellule *in vivo* et l'équivalent *in vitro* a été vu par exemple par l'expression de la Lectine14 dans les cellules ES et qui est absente de l'Epi (Poirier et al., 1992). Enfin, il ne faut pas oublier les artéfacts de la culture *in vitro* comme la différenciation des cellules ES en tissus extraembryonnaire au niveau des CE (Beddington and Robertson, 1989).



## ***IF Reprogrammation épigénétique au cours du développement préimplantatoire***

(Corry et al., 2009; Henckel et al., 2007; Shi and Wu, 2009; Surani et al., 2007)

Un grand nombre d'études s'intéressent à la compréhension du rôle des mécanismes épigénétiques dans le développement précoce. Tout comme pour les études plus « classiques » en génétique, les équipes cherchent à expliquer le passage d'une population de cellules homogènes pluripotentes à une population de cellules hétérogènes composée de différentes identités. Dans la bibliographie on retrouve diverses définitions de l'épigénétique qui se recoupent toutes sur « un ensemble de mécanismes capables de provoquer un changement phénotypique héritable sans altérer la séquence génomique ». Les principaux mécanismes cités en rapport avec le développement préimplantatoire sont la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones, mais également l'inhibition par les petits ARN (RNAi) et la variabilité des histones. Les mutations affectant la majorité des acteurs épigénétiques présentent des phénotypes développementaux sévères et généralement une létalité embryonnaire précoce témoignant ainsi de l'importance de ces mécanismes dans la régulation de l'embryogenèse (Surani et al., 2007).

### **IF-1 Méthylation de l'ADN**

En général, l'hyperméthylation de l'ADN correspond à un état répressif pour la transcription, à l'inverse des régions transcriptionnellement actives majoritairement hypométhylées. Au cours des premières étapes du développement d'importants remaniements de la méthylation de l'ADN ont lieu. Lors de leur maturation l'ADN des gamètes est méthyle apportant l'empreinte parentale. Après la fécondation et à la formation des pronoyaux, la méthylation générale va subir d'importants changements, alors que l'empreinte parentale reste intouchée. En effet, il y a déméthylation active dans le pronoyau mâle par un mécanisme encore inconnu. Ensuite il y a une déméthylation passive du génome entier jusqu'au stade morula, la conséquence de l'absence d'une méthyltransférase de maintien Dnmt1 (**DNA Methyl Transferase 1**) (Rougier et al., 1998).

La re-méthylation ou méthylation de novo ne reprend qu'à la formation du blastocyste grâce à l'action des méthyltransférases Dnmt3 (Okano et al., 1999; Santos et al., 2002). C'est à ce



moment que sont créées les premières différences épigénétiques visibles entre les cellules de l'embryon. Le TE, différencié, restera hypométhylé à l'inverse de la MCI qui montre un niveau de méthylation plus important (Santos et al., 2002) qui va de pair avec l'expression restreinte à l'MCI de DNMT3b (Hirasawa and Sasaki, 2009; Watanabe et al., 2002).

## **IF-2 Modifications d'histones**

Les modifications d'histones sont un deuxième volet important dans la régulation épigénétique de l'embryogenèse. Elles incluent l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation et la sumoylation. Toutes peuvent jouer un rôle, mais l'acétylation et la méthylation sont les événements les plus connus. Additionné à la méthylation de l'ADN, ces modifications peuvent apporter un niveau supplémentaire aux régulations épigénétiques. Comme la méthylation de l'ADN, les modifications des histones sont très dynamiques au cours de la préimplantation et il existe d'importantes différences entre les pronoyaux mâles et femelles (Shi and Wu, 2009).

Il a été montré que ces modifications d'histones sont impliquées dans la pluripotence des cellules de l'embryon précoce en modulant la transcription de gènes clés (Corry et al., 2009).

Par exemple, dans un embryon au stade quatre cellules, les blastomères qui contribueraient majoritairement au TE polaire et à la MCI ont une méthylation maximale de l'histone H3 sur des résidus arginines spécifiques. En revanche ceux qui participeraient plutôt au TE mural présentent une méthylation minimale de l'histone H3 (Torres-Padilla et al., 2007a). La surexpression de CARM1, une arginine méthyltransférase spécifique de H3, dans un blastomère unique dirige la contribution de sa descendance vers la MCI principalement. Ce biais dans la détermination des cellules s'accompagne d'une forte augmentation transcriptionnelle de Nanog et Sox2 (Torres-Padilla et al., 2007a).

Une autre étude, réalisée sur la méthylation des histones dans les cellules ES propose que la combinaison de marques activatrices et inhibitrices de la transcription permet le blocage de la transcription de gènes développementaux tout en permettant une activation transcriptionnelle en réponse à un programme de différenciation donné (Bernstein et al., 2006).



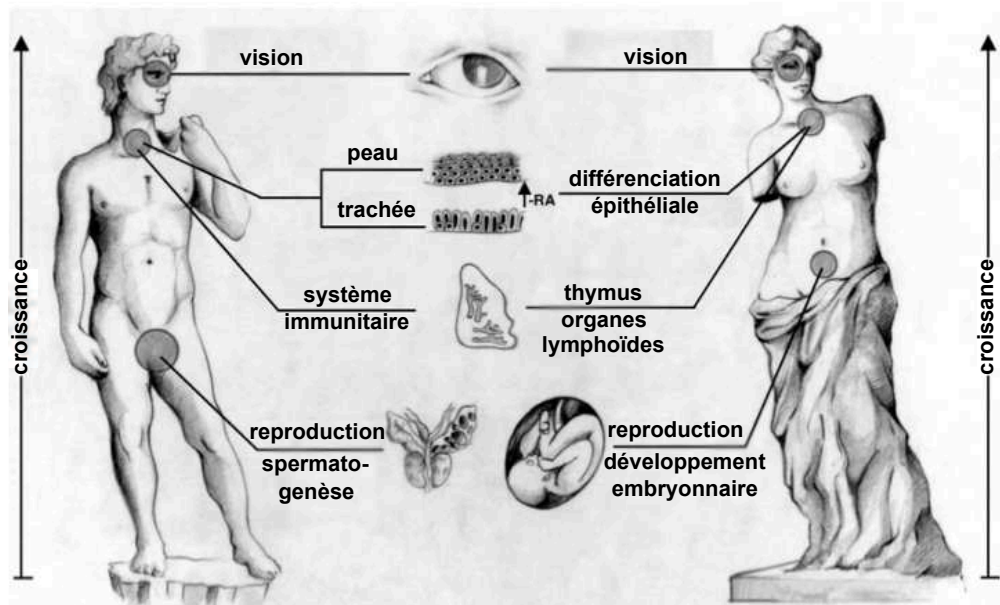


### **IF-3 Inactivation du X**

(Corry et al., 2009)

Chez les mammifères, l'inactivation d'un chromosome X au cours du développement préimplantatoire est très dynamique. De la fécondation et jusqu'au stade morula, le chromosome X paternel (Xp) va être inactivé (Okamoto et al., 2004). Pendant ces stades là, le chromosome X maternel (Xm) reste actif. Par la suite, le chromosome Xp est dérèprimé dans la MCI, mais reste inactif dans le TE (Mak et al., 2004; Okamoto et al., 2004). Après l'implantation, le chromosome Xp est inactif dans tous les tissus extraembryonnaires. Dans la MCI, considérée homogène à l'époque, a lieu l'inactivation aléatoire d'un chromosome X, maternel ou paternel.

Une étude récente montre que le domaine d'expression de Nanog coïncide avec la réactivation du chromosome X inactivé (Silva et al., 2009). Ils montrent que, alors qu'à E3.5 toutes les cellules portent la marque de l'inactivation, un jour plus tard, uniquement les cellules exprimant Nanog et donc l'Epi, perdent cette marque et ont réactivé le X (Silva et al., 2009). Ces résultats sont cohérents avec l'inactivation du chromosome Xp, observé dans tous les tissus extraembryonnaires après l'implantation.



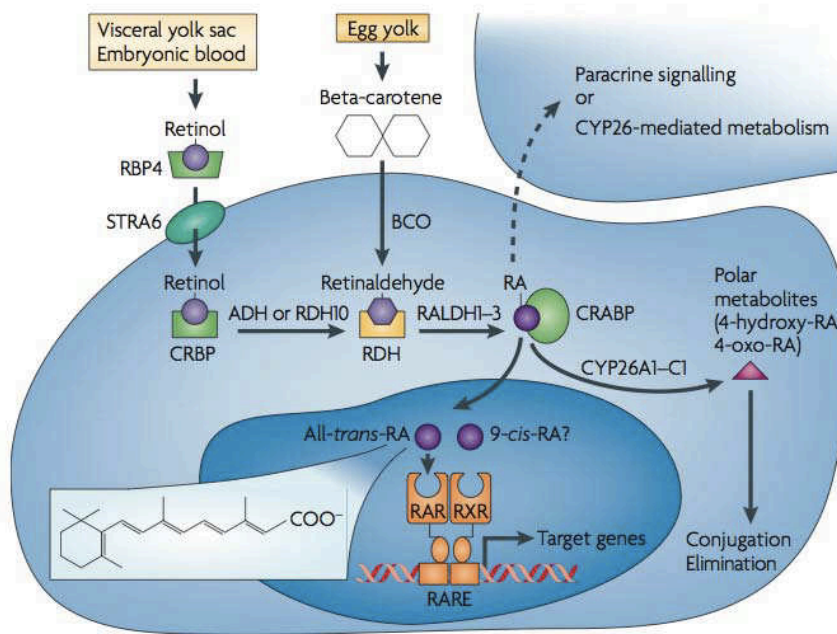
**Fig.14** : Grandes fonctions des rétinoïdes chez l'homme et la femme (traduit de Ross *et al.*, 2000)

## II La voie de signalisation des rétinoïdes

### *IIA Vitamine A et acide rétinoïque dans l'organisme (fig.14)*

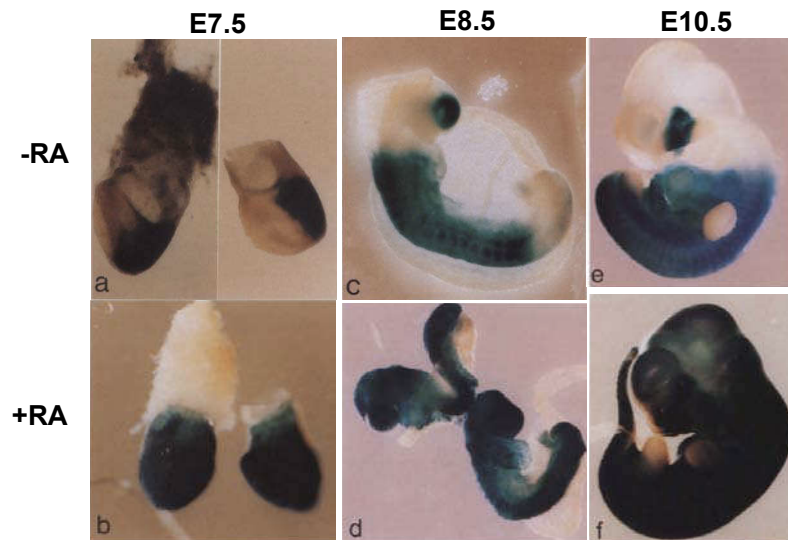
L'acide rétinoïque (AR), une petite molécule lipophile, est le dérivé actif de la vitamine A aussi appelée rétinol. L'ensemble de la vitamine A et de ses différents dérivés est regroupé sous le terme de « rétinoïdes ». L'importance de cette voie de signalisation mise en évidence dès le début du 20<sup>ième</sup> siècle avec la découverte par différentes équipes d'une substance, qu'ils baptisèrent substance « liposoluble A ». Ils ont montré qu'elle est indispensable pour une croissance normale des rats et souris et l'absence ou la carence entraînait des infections oculaires et troubles de la vision. Ces phénotypes lui ont valu son nom « rétinol » (Moore, 1965). Les premiers phénotypes de carence maternelle en vitamine A au niveau embryonnaire ont été analysés environ 20 années plus tard. Regroupées sous le terme de « syndrome de déficience fœtale en vitamine A », il s'agit de malformations du tract urogénital, respiratoire et cardio-vasculaire. De nombreuses anomalies congénitales ont également été associées à un excès en rétinol tels que des défauts au niveau des yeux et du cerveau (Cohlan, 1953). Il est donc clair qu'une balance précise de la vitamine A est importante durant le développement embryonnaire.

La vitamine A est d'origine alimentaire chez l'adulte et d'origine maternelle au cours du développement. Elle peut être ingérée sous forme de caroténoïdes (son précurseur naturel), principalement le  $\beta$ -carotène, contenus dans les légumes et fruits principalement orangés ou sous forme d'esters de rétinol contenus dans les aliments d'origine animale. Dans l'organisme, le  $\beta$ -carotène ou l'ester de rétinol ingéré est digéré, absorbé et transporté vers le foie où il est stocké sous forme d'esters de rétinol. Le rétinol est ensuite acheminé vers les cellules cibles par la circulation sanguine. Ce transport dans le plasma est facilité par sa liaison à des protéines de type RBP (**R**etinol **B**inding **P**rotein). L'entrée du rétinol est facilitée par un transporteur membranaire et récepteur de RBPs, STRA6 (Kawaguchi et al., 2007). La molécule est ensuite prise en charge par les CRBP (**C**ellular **R**etinol **B**inding **P**rotein) qui facilitent sa conversion en rétinyl-esters pour le stockage mais également sa présentation aux enzymes de synthèse de l'AR. Une fois dans les cellules, le rétinol va subir une suite de



**Fig.15** : Transport, métabolisme et signalisation des rétinoïdes dans les cellules embryonnaires. Les sources de rétinoïdes sont le rétinol circulant maternelle pour les espèces placentaires et les caroténoïdes stockés dans le jaune d'œuf des espèces ovipares. Le rétinol circulant est absorbé dans les cellules grâce au récepteur membranaire STRA6. Ensuite, il est pris en charge par des protéines CRBP (cellular retinoid binding protein) et présenté aux enzyme de synthèse de l'acide rétinoïque (AR). L'AR ainsi obtenu peut activer la transcription de gènes cibles dans le noyau, passer dans d'autres cellules pour un effet paracrine ou est dégradé par les enzymes CYP26 et éliminé (Niederreither et Dollé, 2008).

transformations conduisant à la production d'acide rétinoïque (AR) qui pourra alors jouer son rôle dans l'activation transcriptionnelle de gènes cibles (fig.15).



**Fig.16** : Activité de la voie des rétinoïdes, embryons transgéniques portant un gène lacZ sous contrôle d'un promoteur hsp68 en aval de l'élément de réponse RARE de RAR $\beta$  (Rossant *et al.*, 1991). Les embryons sont coloré au X-gal et traités (b,d,f) ou non (a,c,e) par l'acide rétinoïque.

## ***IIB Métabolisme de l'acide rétinoïque au cours du développement***

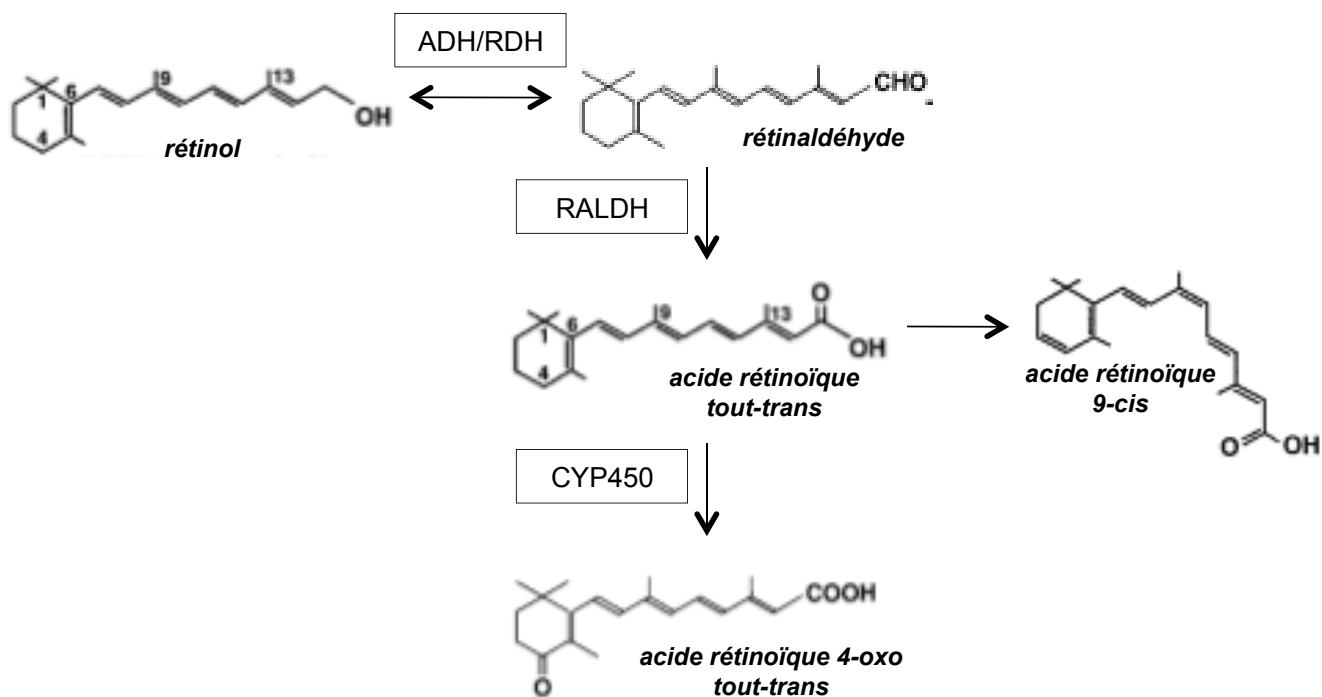
### **IIB-1 La synthèse de l'acide rétinoïque**

Une fois entrée dans la cellule, une molécule de rétinol est prise en charge par les CRBP (Cellular Retinol Binding Protein) qui facilitent sa conversion en rétinyl-esters pour le stockage mais également sa présentation aux enzymes de synthèse de l'AR (Niederreither and Dolle, 2008). Des expériences de lignée rapportrice montrent la présence d'AR et sa signalisation dès E7.5. Les souris transgéniques portant le gène *hsplacZ* sous contrôle de trois éléments de réponse à l'AR, RARE (Retinoic Acid Response Element), montre son expression dès le jour E7.5 dans la partie postérieure de l'embryon et tout le long de la ligne primitive (fig.16) (Rossant et al., 1991). De plus, la culture d'explants sur une lignée de cellules rapportrice F9 RARE-lacZ montre que les embryons à E7.5, mais pas à E6.5 possèdent l'AR capable d'induire l'expression de la  $\beta$ -galactosidase dans les cellules (Ang et al., 1996). Ceci suggère la présence de synthèse active d'AR dans l'embryon dès E7.5 quand la gastrulation a débuté. La différence de détection d'un jour entre les expériences décrites montre que l'absence de preuves d'activité de la signalisation rétinoïde avant ces stades peut être due à la limite des techniques utilisées. Cette synthèse se fait en étapes d'oxydation : d'abord le rétinol est transformé en rétinaldéhyde puis celui-ci est converti en AR (fig.17). Ces deux étapes sont réalisées par différentes familles de déshydrogénases présentées ci-dessous.

Trois familles de déshydrogénases jouent un rôle important dans la synthèse d'AR durant le développement embryonnaire : les alcool-déshydrogénases (ADH) et les déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDR) catalysent la première oxydation (Niederreither and Dolle, 2008; Pares et al., 2008) et les rétinaldéhyde-déshydrogénases (RALDH ou ALDH) la deuxième (Duester, 2008; Duester et al., 2003).

Trois ADH jouent un rôle majeur dans la conversion du rétinol en rétinaldéhyde : ADH1, 3 et 4. L'expression de *Adh3* est ubiquitaire pendant le développement contrairement à *Adh1* et *Adh4* qui sont exprimés de façon tissu spécifique. Les mutants *Adh3*<sup>-/-</sup> ont une sensibilité accrue à une déficience en vitamine A. En absence d'AR, ces embryons vont développer de plus importants phénotypes, témoignant du rôle important de Adh3 dans la production d'AR





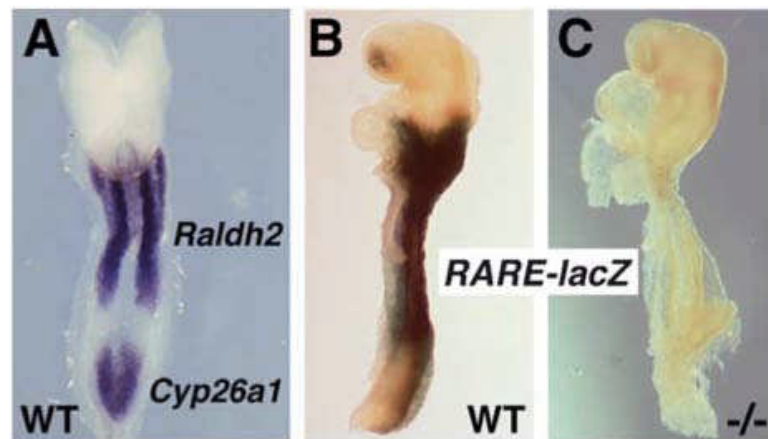
**Fig.17** : Synthèse et dégradation de l'acide rétinoïque : le rétinol ou vitamine A est oxydé en rétinaldéhyde par les ADH et RDH. Cette réaction est réversible contrairement aux oxydations qui suivent. Le rétinaldéhyde ou rétinol est ensuite transformé en acide rétinoïque tout-trans (Artt) ou 9-cis (AR9cis) par les rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDH). La dégradation de l'AR se fait par les cytochromes P450 (CYP450).

endogène (Deltour et al., 1999). ADH1 et ADH4 sont également impliquées dans la production de rétinaldéhyde, mais leur fonction est plus restreinte que pour ADH3. En effet, elles sont exprimées dans seulement quelques régions. L'absence *in vivo* de ces enzymes n'entraîne pas de problèmes de croissance ou de survie comme cela a été observé pour les souris *Adh3*<sup>-/-</sup> dans les conditions normales (Deltour et al., 1999). En revanche, les mutants *Adh1*<sup>-/-</sup> présentent une perte importante du métabolisme rétinolique conduisant à une toxicité due à l'excès de rétinol (Molotkov et al., 2002b). Enfin, lorsque *Adh4* est invalidé génétiquement, la même sensibilité à un déficit en vitamine A que pour les mutants pour *Adh3* peut être observé (Deltour et al., 1999). La double invalidation de *Adh1* et *Adh4* reproduit le phénotype des mutants *Adh4*<sup>-/-</sup> en cas de déficit en rétinol et le phénotype des mutants simples *Adh1*<sup>-/-</sup> dans le cas d'un excès en rétinol (Molotkov et al., 2002a). Les enzymes ADH1 et ADH4 ont donc des fonctions distinctes, qui ne se recoupent pas dans le métabolisme du rétinol (Molotkov et al., 2002a).

Deux enzymes de la famille SDR ont été identifiées dans la synthèse d'AR durant l'embryogenèse : RDH1 et RDH10 (**R**etinol **D**es**H**ydrogénase). Comme pour *Adh1,3* et *4* l'invalidation de *Rdh1* n'est pas létale dans les conditions standard d'apport en rétinol. Il est exprimé dans une grande partie de l'embryon dès E7.5 et plus spécifiquement dans le foie et les reins par la suite. Les souris *Rdh1*<sup>-/-</sup> présentent une augmentation de rétinyl-esters montrant que la conversion du rétinol est bloquée et qu'il est donc stocké (Zhang et al., 2007). Contrairement aux autres ADH et RDH, l'absence de l'enzyme RDH10 conduit à un phénotype très sévère avec une létalité précoce vers E13. Ces mutants peuvent toujours maintenir une synthèse d'AR dans quelques tissus isolés, ADH1,2 et 3 et RDH1 sont donc capables de cataboliser la réaction de rétinol et rétinaldéhyde (Sandell et al., 2007).

A l'inverse de la première réaction d'oxydation du rétinol en rétinaldéhyde, la deuxième produisant l'AR est irréversible (fig.17). Cette réaction est catabolisée par les Aldh1a (ou Raldh). Chez la souris, 3 membres (ALDH1a1, 2 et 3) sont impliqués dans la formation d'AR (Duester et al., 2003).

Aldh1a2 (ou ALDH1A2) est le membre avec la plus grande spécificité pour son substrat (Zhao et al., 1996). Il a été montré qu'elle est indispensable à la survie embryonnaire et la morphogénèse précoce. Les embryons *Aldh1a2*<sup>-/-</sup> meurent vers la moitié de la gestation, incapables de réaliser leur rotation axiale (Niederreither et al., 1999). Ils présentent de graves défauts dans la formation du cœur et entre autres un raccourcissement de l'axe antéro-postérieur. Le sauvetage de ce phénotype par administration d'AR via la mère confirme que le



**Fig.18** : Synthèse et activité d'AR *in vivo* ; (A) : expression de *Raldh2* par hybridation in situ dans embryons sauvages (WT) à E8.5, elle est similaire à la région où la signalisation par AR est active (B, reporter *RARE-lacZ*). L'activité de l'AR est perdue lorsque *Raldh2* est invalidé, il joue donc un rôle essentiel à ce niveau (C, -/-). (Molotkova *et al.*, 2005)

défaut est effectivement la suite du manque d'AR et confirme son rôle à ce niveau (Mic et al., 2002; Niederreither et al., 1999). *Aldh1a2* est exprimé dans la partie présomitique du mésoderme et sa distribution y est similaire à celle de la détection l'AR à E7.5 comme le montrent les expériences de gène rapporteur, *RAREhspLacZ* (fig.18) (Molotkova et al., 2005; Niederreither et al., 1999).

Par la suite deux autres membres de la famille peuvent prendre le relais au niveau des yeux et des ébauches olfactives : *Aldh1a1* et 3 (Molotkov et al., 2006). Les mutants pour *Raldh1* sont viables et fertiles, mais présentent des taux anormalement fort de rétinylesters et rétinaldéhyde dans le foie (Fan et al., 2003). Il est donc probable qu'il y ait redondance fonctionnelle avec par exemple *Aldh1a3* pour compenser l'absence de *Aldh1a1*. *Aldh1a3* est exprimé dès E8.75, également de façon région spécifique, entre autres au niveau des vésicules optiques et des futurs systèmes olfactifs et acoustiques (Mic et al., 2002; Mic et al., 2000). En absence de cette enzyme, les souriceaux meurent à la naissance avec des défauts nasaux et présentent un léger retard dans la croissance rétinienne (Dupe et al., 2003). D'autres invalidations de *Raldh3* entraînent des défauts oculaires plus importants, peut-être dus à une différence de lignée, mais toujours témoignant de l'importance d'*Aldh1a3* dans le développement de la rétine et de l'œil (Matt et al., 2005; Molotkov et al., 2005). Les doubles mutants pour *Aldh1a1* et *Aldh1a3* présentent le même phénotype que pour *Aldh1a3* seul témoignant du rôle important d'*Aldh1a3* dans le développement de l'œil comparé à *Aldh1a1* (Molotkov et al., 2006).

## **IIB-2 la dégradation de l'acide rétinoïque**

L'élimination d'acide rétinoïque passe principalement par le métabolisme cellulaire. Les enzymes responsables de la clairance de l'AR au cours du développement et dans l'organisme adulte sont les protéines Cyp26. Chez la souris comme chez l'Homme il existe trois gènes codant pour des Cyp26 : *Cyp26a1*, *Cyp26b1* et *Cyp26c1*. Au cours du développement, ces enzymes ont des domaines d'expression précis dans l'espace et dans le temps.

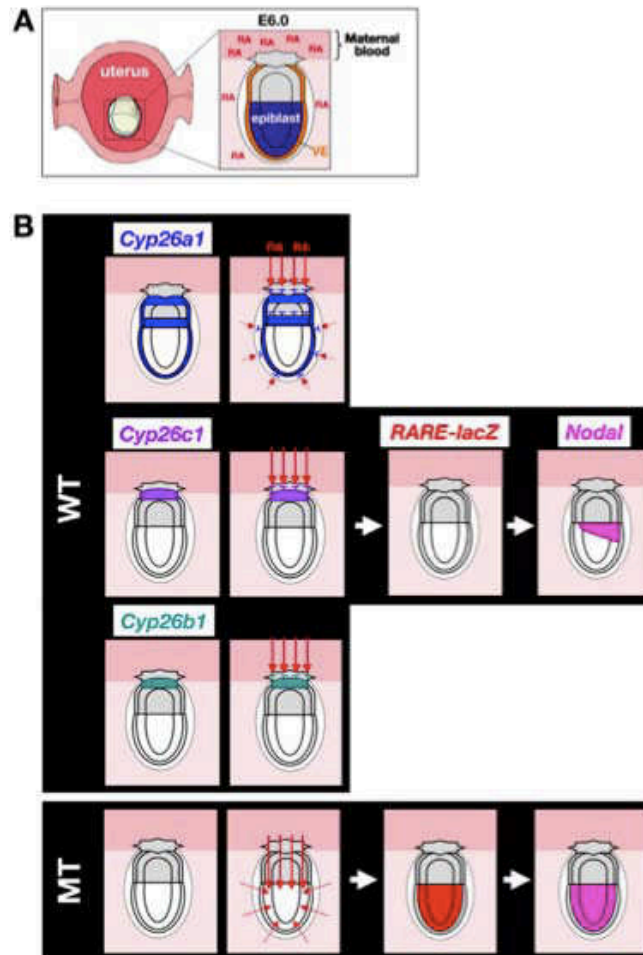
*Cyp26a1* est le premier membre identifié de la famille et est un gène inductible par l'AR (Fujii et al., 1997; Loudig et al., 2005). Il est exprimé dans l'embryon dès E5.5 dans l'ectoderme et l'endoderme extraembryonnaire et dans le VE (Fujii et al., 1997; Uehara et al., 2009). Par la suite, il est également détecté dans le mésoderme et fortement au niveau de la



ligne primitive. Entre E7.25 et E8.5 ont lieu d'importants changements dans le profil d'expression de *Cyp26a1*. En effet, il y a une très forte augmentation dans les régions antérieures de l'embryon (Fujii et al., 1997). Plus tard dans le développement, son expression se retrouve principalement dans deux régions. Une région antérieure avec les cellules de la crête neurale et une région postérieure incluant la plaque neurale caudale, l'ébauche de la queue et la partie postérieure des futurs intestins (Abu-Abed et al., 2001; Fujii et al., 1997). De façon intéressante, les domaines d'expression de *Cyp26a1* et de *Raldh2* sont complémentaires dans le développement caudal mettant ainsi en évidence la régulation précise de l'AR dans le développement. L'absence de *Cyp26a1*, obtenue par recombinaison homologue, entraîne des défauts très sévères dans le développement des structures postérieures de l'embryon entraînant une létalité vers la moitié de la gestation (Abu-Abed et al., 2001). Ces mutants présentent des troncations postérieures avec des malformations graves des membres postérieurs, de la queue et du système uro-génital, mais également des problèmes dans la mise en place du cerveau (Abu-Abed et al., 2001).

L'expression de *Cyp26b1* est également présente dès E6.25. Des expériences récentes d'hybridation in situ montrent la présence d'ARNm au niveau du cône ectoplacentaire (Uehara et al., 2009). Par la suite, il est exprimé spécifiquement dans les rhombomères 3 et 5 puis distalement dans les ébauches des membres et au niveau du futur nez, mandibule et maxillaire (MacLean et al., 2001). L'invalidation de *Cyp26b1* entraîne une malformation des membres avec des défauts importants dans le « patterning ». On peut également observer des problèmes osseux, montrant l'importance de *Cyp26b1* dans la protection des chondrocytes contre l'apoptose et dans leur maturation (Yashiro et al., 2004). Ce phénotype s'approche de celui observé en cas d'excès en AR mettant de nouveau en valeur le rôle des *Cyp26* dans la clairance de l'AR au cours du développement.

Le troisième membre de la famille est *Cyp26c1*. Comme pour *Cyp26b1*, son expression a été montrée dès E6.25 dans le cône ectoplacentaire (Uehara et al., 2009). Par la suite, il est exprimé dans certains rhombomères (2 et 4), le futur cerveau et le premier arc branchial ainsi que les épithéliums buccaux et dentaires (Tahayato et al., 2003). Le simple mutant *Cyp26c1* ne présente pas d'anormalités phénotypiques apparentes. Le cerveau se développe quasi normalement sans doute grâce à l'expression maintenue de *Cyp26a1* (Uehara et al., 2007). En revanche, la double invalidation *Cyp26a1c1*<sup>-/-</sup> phénocopie l'embryopathie sévère liée à un excès d'AR avec des malformations plus importantes que dans les simples mutants (Uehara et al., 2007). On peut observer des défauts dans la mise en place « antéro-postérieure » du cerveau suggérant que *Cyp26a1* et *Cyp26c1* coopèrent dans sa mise en place. De façon

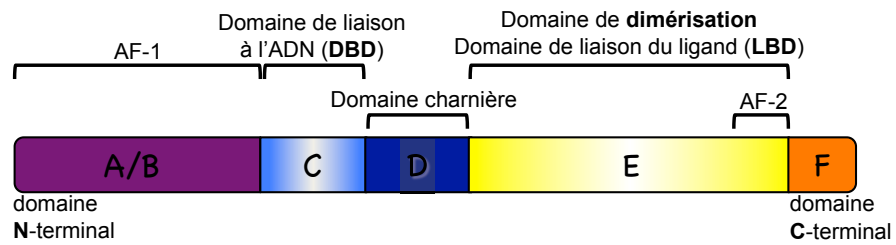


**Fig.19** : Modèle de protection de l'épiblaste contre l'AR maternel. (A) dans l'embryon avant la gastrulation, l'AR est présent dans le sérum, Raldh2 est exprimé dans la décidue. (B) Domaines d'expression des CYP26 dans l'embryon sauvage (WT) et effet inducteur de l'AR maternel sur l'expression de Nodal via ses RARE (Uehara *et al.*, 2009)

intéressante, ce phénotype du système nerveux central est sauvé par la mutation nulle de *Raldh2* appuyant l'hypothèse qu'un excès d'AR entraîne le phénotype *Cyp26a1c1<sup>-/-</sup>* (Uehara et al., 2007). Récemment, l'étude du triple mutant *Cyp26a1b1c1<sup>-/-</sup>* a permis de mettre en évidence un rôle plus précoce de la dégradation d'AR (Uehara et al., 2009). Ils observent dans ces embryons une duplication partielle ou entière de l'axe corporel et du tube neural avec une la duplication du marquage de la ligne médiane par *Shh* (Sonic hedgehog) et de la ligne primitive par *T* (Brachyury). Ce phénotype est proche de celui observé pour les mutants de *Lefty1* et *Cer1*, des antagonistes de Nodal (Perea-Gomez et al., 2002). En concordance avec cette similarité, ils trouvent une expression anormale de *Nodal* normalement postérieure, dans tout l'Epi (Uehara et al., 2009). C'est cette dérégulation de Nodal qui est responsable du phénotype sévère des embryons *Cyp26a1b1c1<sup>-/-</sup>* car son invalidation permet d'empêcher la duplication de la ligne médiane. Enfin, ils montrent que l'AR régule directement Nodal par deux séquences RARE au sein d'une région régulatrice de Nodal. Ils émettent le modèle d'une protection de l'AR maternel de l'Epi par les Cyp26 dans quel cas l'expression de Nodal est indépendante de l'induction par l'AR. Dans les mutants où cette protection est perdue, Nodal serait donc activé dans l'Epi en entier directement par l'AR via les RARE (fig.19) (Uehara et al., 2009). Les expériences de gènes rapporteur *RAREhspLacZ* dans les triples embryons *Cyp26a1b1c1<sup>-/-</sup>* montrent l'activité importante de la voie des rétinoïdes dans l'épiblaste des embryons, qui en est normalement dépourvu (Uehara et al., 2009). Les Cyp26 exprimés dans les tissus extraembryonnaires protègent donc l'Epi de l'activation ectopique par l'AR de la transcription de gènes, comme par exemple, Nodal.

Les phénotypes observés dans les simples, doubles et triples mutants montrent que Cyp26a1 est l'enzyme de dégradation de l'AR la plus importante dans le développement. Les doubles et triples invalidations montrent qu'il y a coopération entre les enzymes. En effet, on peut observer des défauts plus importants dans les embryons *Cyp26a1c1<sup>-/-</sup>* et *Cyp26a1b1c1<sup>-/-</sup>* (Uehara et al., 2007; Uehara et al., 2009). L'aggravation des phénotypes montre également qu'il doit exister une redondance fonctionnelle partielle entre ces trois enzymes.





**Fig.20** : Schéma de la structure commune de la superfamille des récepteurs nucléaires

## ***IIC Signalisation cellulaire : les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque***

### **IIC-1 Structure et fonctionnement des récepteurs RAR et RXR**

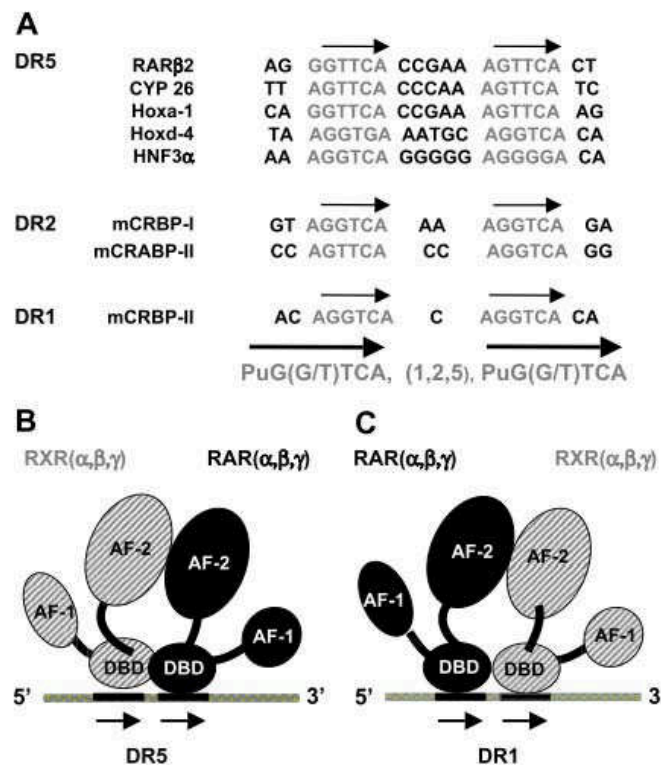
Il est établi depuis longtemps maintenant que l'AR exerce son rôle en régulant l'expression de gènes spécifiques dans les tissus cibles. Les études approfondies de ce mécanisme ont montré que contrairement à de nombreux autres signaux morphogènes, l'AR se lie à des récepteurs nucléaires pour directement activer la transcription de gènes cibles. Il existe deux types de récepteurs nucléaires à l'AR : les RAR (Retinoic Acid Receptor) qui lient l'AR tout-trans (AR<sub>tt</sub>) et l'AR 9-cis (AR<sub>9cis</sub>) et les RXR qui lient exclusivement l'AR<sub>9cis</sub> (Retinoic X Receptor) et qui agissent en hétérodimère RAR/RXR au cours du développement chez la souris (Kastner et al., 1997; Mangelsdorf et al., 1995). Chaque type de récepteur est codé par 3 gènes distincts :  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ . Il existe plusieurs isomères de ces gènes, différant uniquement dans leur extrémité N-terminale, issus de l'épissage alternatif : RAR $\alpha_1, \alpha_2$ ,  $\beta_1$  à  $\beta_4$ ,  $\gamma_1$  et  $\gamma_2$  ainsi que RXR $\alpha_1$  à  $\alpha_3$ ,  $\beta_1$  à  $\beta_3$  et  $\gamma_1$  à  $\gamma_4$  (Kastner et al., 1995).

Les récepteurs de l'AR font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils agissent directement dans le noyau en tant que facteurs de transcription. Chez la souris on compte 49 membres dans la famille des récepteurs nucléaires. Ils sont regroupés sous trois catégories : les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (dont les récepteurs aux oestrogènes et androgènes), les récepteurs aux hormones non stéroïdiennes dont font parti les RAR et enfin les récepteurs dits « orphelins » dont le ou les ligands n'ont pas encore été identifiés, mais qui sont très peu nombreux maintenant.

Les récepteurs nucléaires ont une structure commune, composée de modules possédant des structures spécifiques (fig.20) (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Chambon, 1996; Dilworth and Chambon, 2001).

En N-terminal, la région A/B porte une fonction d'activation ligand-indépendante (AF-1) dont la séquence est très variable. Plusieurs sites de phosphorylation pour les CDKs et MAP kinases ont été identifiés, mais la fonction de cette région n'est pas encore élucidée.

La région C, très conservée, comporte le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour **D**N**A**-**B**inding **D**omain) qui lui confère la reconnaissance site spécifique de l'ADN. Elle est



**Fig.21** : Eléments de réponse à l'AR (A) Exemple de RARE de différents gènes selon un motif DR5, 2 et 1 (B et C) Hétérodimères RAR/RXR liés sur leurs éléments de réponses DR5 ou DR1 (Bastien et Rochette-Egly, 2004)

composée de deux doigts de zinc, deux hélices  $\alpha$  et d'un domaine d'extension C-terminal (CTE).

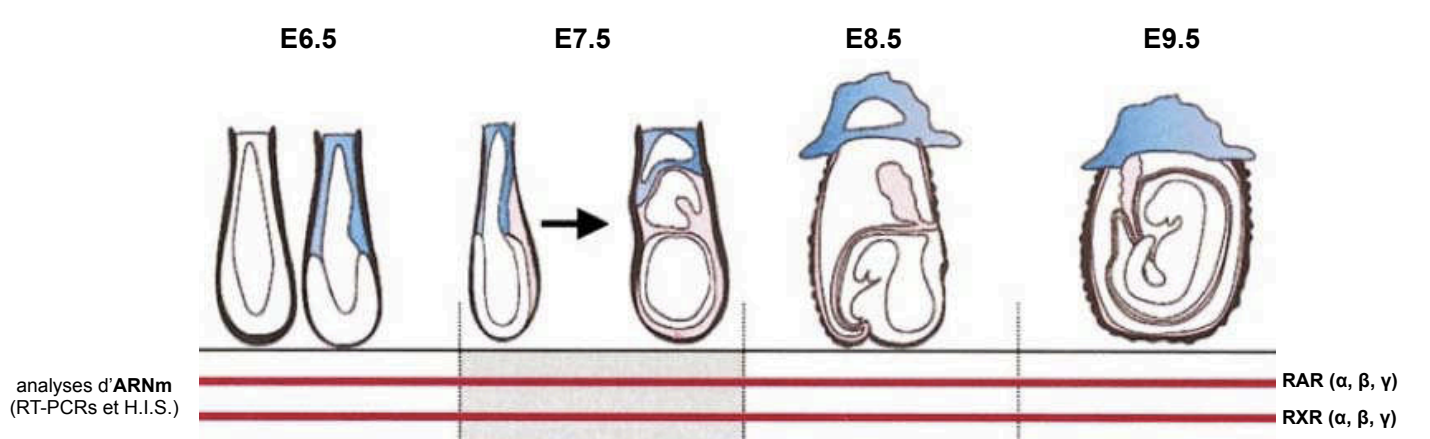
Le domaine D est un domaine charnière qui permet la rotation du DBD. le changement de conformation nécessaire à la fixation du récepteur sur le RARE. Cette région joue également un rôle important dans le recrutement de co-répresseurs.

La région E est la deuxième plus conservée après la région C. Sa composition est complexe car elle forme la poche de reconnaissance du ligand ainsi que le site de dimérisation et une fonction d'activation ligand-dépendante (AF-2). La fonction AF-2 permet le recrutement de co-activateurs de la transcription par le récepteur.

La région C-terminale, F, est une région dont la fonction est inconnue pour les RARs et qui est absente des RXRs.

## **IIC-2 Mode d'action des RXR/RAR**

En absence de ligand, les récepteurs à l'AR sont localisés dans le noyau. Les hétérodimères sont liés à leur élément de réponse le RARE. La séquence consensus des RARE est composée de deux répétitions directes d'un motif hexamérique : PuG(G/T)TCA. L'élément de réponse classique, DR5 (**D**irect **R**epeat **5**), est une telle répétition directe espacée de 5 paires de bases, mais les hétérodimères RAR/RXR peuvent entre autres également lier des DR1 et DR2, espacés de 1 ou 2 paires de bases respectivement. De façon intéressante, la liaison des récepteurs sur l'ADN est inversée entre les motifs DR5 (RXR/RAR) et DR1 (RAR/RXR) ce qui les fait passer d'une fonction activatrice à une fonction répressive de la transcription (Bastien and Rochette-Egly, 2004). Les motifs DR5 ont été identifiés dans de nombreux gènes cibles de l'AR dont des acteurs de la voie même et différents gènes impliqués dans le développement (fig.21) (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Dilworth and Chambon, 2001). Un des premiers gènes induits par l'AR identifié est *RAR $\beta$* , d'abord dans les cellules humaines (de The et al., 1989), puis une séquence RARE a été identifiée dans le promoteur (de The et al., 1990). Un certain nombre de gènes de la famille *Hox* sont également connus pour être induit par l'AR entre autre dans la mise en place antéro-postérieure du cerveau (Duester, 2008; Dupe et al., 1997; Dupe et al., 1999; Marshall et al., 1996).



**Fig.22** : Expression précoce des récepteurs à l'acide rétinoïque RAR et RXR. Tous sont exprimés dès E6.5 de façon ubiquitaire (RXRα) ou tissu/organe spécifique (RARα, RARβ, RARγ, RXRβ, RXRγ) (adapté et traduit de Ulven *et al.*, 2000).

	RARα	RARβ	RARγ
<b>Cerveau</b>	rhombomères 4 et 7, bulbe olfactif, cortex, hippocampe, hypothalamus, cerebellum	rhombomère 7, tubercule olfactif, putamen, accumbens, hypothalamus, méninges, plexus choroïde	-
<b>moelle épinière</b>	+	neurépithélium ventral	plaque neurale précoce (expression passagère)
<b>œil</b>	+	mésenchyme oculaire et péri-oculaire, épithélium pigmentaire	
<b>oreille interne</b>	+	mésenchyme, membrane basilaire, cristae	+
<b>structures nasales</b>	+	mésenchyme, épithélium olfactif	capsule nasale
<b>glande pituaire</b>	+	+ (régionalisé)	-
<b>palate ???</b>	+	+ (régionalisé)	précartilage
<b>glandes salivaires</b>	+	mésenchyme	épithélium
<b>glande thyroïdienne</b>	+	-	-
<b>trachée</b>	+	+	mésenchyme
<b>poumons</b>	+	bronches proximales	+
<b>cœur</b>	+	myocarde, mésenchyme conotruncal	coussins endocardiaques
<b>estomac</b>	+	+ (régionalisé)	épithélium squameux
<b>intestin</b>	+	épithélium, mésenchyme externe (régionalisé)	
<b>foie</b>	+	capsule	-
<b>pancréas</b>	+	mésenchyme	-
<b>reins</b>	+	stroma	-
<b>gonades</b>	+	-	-
<b>peau</b>	+	-	épiderme
<b>squelette</b>	+	-	condensations précartilagineuses (dérivées ou non de la crête neurale)
<b>membres</b>	+	mésenchyme proximal, régions entre les doigts	mésenchyme précoce, condensations précartilagineuses

**Fig.23** : Tableau récapitulatif de l'expression des récepteurs à l'acide rétinoïque, RAR, dans les principaux organes au cours du développement chez la souris. (+) = expression ubiquitaire et diffuse, (-) = aucune expression n'as été détectée (traduit de Dollé, 2009).

En absence d'AR, les récepteurs sans ligands vont réprimer la transcription de leurs gènes cibles en recrutant les co-répresseurs NCoR et SMRT. A la liaison du ligand, les récepteurs doivent s'affranchir de la structure répressive de la chromatine afin de pouvoir recruter toute la machinerie transcriptionnelle. A cette fin, des changements de conformation ligand-induits permettent le départ des corépresseurs et la fixation de co-activateurs tels que la famille de SRC/p160. Ces derniers vont permettre le remodelage de la chromatine et donc le recrutement et le positionnement de la machinerie transcriptionnelle (Bastien and Rochette-Egly, 2004). De plus, il a été montré que la protéine CRABPII facilite l'acheminement de l'AR au noyau et sa liaison aux récepteurs (Duester, 2008; Sessler and Noy, 2005). L'activité des RAR et RXR peut également être régulée par leur phosphorylation. Les phosphorylations peuvent avoir un effet activateur ou inhibiteur en promouvant leur dégradation (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Rochette-Egly, 2003).

### **IIC-3 Etudes développementales des récepteurs RAR et RXR**

#### *IIC-3 a) Expression des récepteurs au cours du développement postimplantatoire*

L'expression des récepteurs à l'AR au cours du développement a été étudiée au cours de ces 20 dernières années principalement grâce à l'hybridation *in situ*. Tous les récepteurs, *RAR* et *RXR*, sont exprimés dès E6.5 (fig.22) (Dolle, 2009; Ulven et al., 2000).

A E6.5 et de façon ubiquitaire, *RAR* $\gamma$  est exprimé dans les tissus embryonnaires alors que *RAR* $\alpha$  est exprimé dans les tissus extraembryonnaires (Ang and Duester, 1997). Aux stades présomitiques, l'expression de *RAR* $\alpha$  et *RAR* $\gamma$  est très faible et diffuse alors que *RAR* $\beta$  est exprimé dans le mésenchyme rostral et plus latéralement dans l'embryon, mais de façon tissu-non-spécifique (Ang and Duester, 1997; Ruberte et al., 1991; Ulven et al., 2000). Les expériences de RT-PCR montrent que les *RXR* sont également exprimés à E7.5, mais on ne connaît pas leur localisation au niveau de l'embryon (Ulven et al., 2000). Après la gastrulation, les profils d'expression des récepteurs deviennent tissu- ou région-spécifique pour la plupart (fig.23). *RAR* $\alpha$  et *RAR* $\beta$  sont plus particulièrement exprimés dans le cerveau, dans les organes sensoriels en développement (les yeux, l'oreille interne, les structures nasales) et dans un certain nombre d'organes (les poumons, le cœur, foie, pancréas, reins). L'expression de *RAR* $\gamma$  est moins répandue. Elle est absente du cerveau et d'organes comme le foie et les reins (Dolle, 2009). L'expression de *RXR* $\alpha$  est très répandue au cours du

A	Mutations nulles de	phénotypes observés (sélection)
	RAR $\alpha$	retard de croissance, stérilité mâle, malformations osseuses et cartilagineuses (vertèbres cervicales, larynx), ...
	RAR $\beta$	retard de croissance, perturbations du comportement, persistance/hyperplasie du corps vitreux primaire, ...
	RAR $\gamma$	retard de croissance, stérilité mâle, malformations osseuses et cartilagineuses (vertèbres cervicales, larynx, squelette), ...
	RXR $\alpha^{+/-}$	retard de croissance, doigts palmés
	RXR $\alpha$	hypoplasie cardiaque, défauts du développement oculaire
	RXR $\beta$	stérilité mâle, métabolisme lipidique anormal dans les cellules de Sertoli, perturbations du comportement
	RXR $\gamma$	perturbations métaboliques et comportementales
B	Mutations nulles de	phénotypes observés (résumé)
	RAR $\alpha$ /RAR $\beta$	défauts du système respiratoire et urinaire et du système génital femelle, persistance et hyperplasie du corps vitreux primaire, malformations osseuses, cartilagineuses et cardiaques
	RAR $\alpha$ /RAR $\gamma$	problèmes du développement cardiaque, oculaire et glandulaire, défauts du système urinaire et génital, malformations osseuses et cartilagineuses
	RAR $\beta$ /RAR $\gamma$	malformations cardiaques et oculaires, des uretères et des vertèbres cervicales, défauts du système génital femelle, doigts palmés

**Fig.24** : Tableaux récapitulatifs des principaux phénotypes observés pour les mutations nulles des récepteurs à l'acide rétinoïque (Mark *et al.*, 2009) : (A) phénotypes observés pour les mutations nulles simples, les souriceaux sont viables ; (B) phénotypes observés pour les embryons/fœtus double mutants pour deux récepteurs RAR, les individus double mutants meurent avant ou à la naissance.

développement et durant la vie adulte. Inversement *RXRβ* et plus particulièrement *RXRγ* ont une expression plus restreinte, tissu-spécifique (Mangelsdorf et al., 1992; Mark et al., 2009). *RXRγ* est majoritairement exprimé dans les muscles squelettiques, dans le cœur et les épithéliums sensoriels (Krezel et al., 1996; Mangelsdorf et al., 1992).

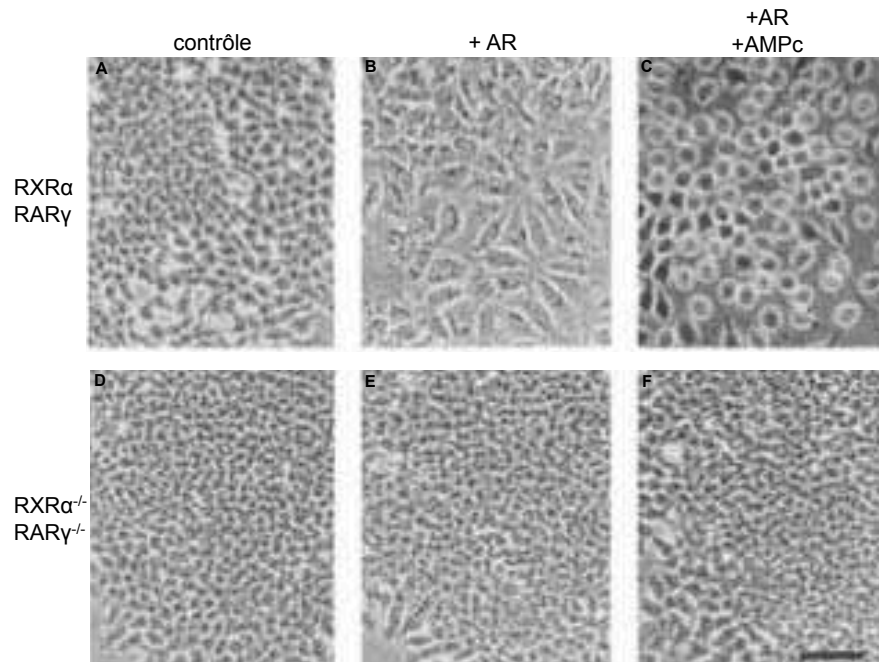
Les simple mutants *RARα*, *β* ou *γ* sont tous viables à la naissance. Les phénotypes observés correspondent généralement aux défauts observés dans les « syndromes de déficience fœtale en vitamine A » avec d'autres malformations correspondant aux régions/organes où est exprimé le récepteur muté. Cette viabilité est sûrement due aux redondances possibles entre les différents RARs (Kastner et al., 1995; Mark et al., 2006; Mark et al., 2009). Des doubles mutants RAR pour deux gènes ou deux isoformes du même gène ont été générés afin d'explorer cette piste. Les double mutants *RARα/β*, *RARα/γ* et *RARβ/γ* ne sont pas viables et meurent avant ou à la naissance. Ils présentent une large variété de défauts plus sévères que les simples mutants, récapitulant la majorité des malformations observées dans les « syndromes de déficience fœtale en vitamine A » ainsi que les phénotypes observés dans les embryons déficients en vitamine A comme dans les mutants pour *Raldh2*, *Rdh10* ou *Stra6* (Kawaguchi et al., 2007; Niederreither et al., 1999; Sandell et al., 2007). Ces observations renforcent l'idée d'une redondance fonctionnelle entre les récepteurs à l'AR (fig.24).

L'invalidation génique des différents acteurs de la voie rétinoïde, dont les enzymes métaboliques et les récepteurs nucléaires montrent l'importance de cette voie dans de nombreux événements développementaux et organes (Duester, 2008; Mark et al., 2009).

Les embryons invalidés pour *RXRα* meurent à E14.5 suite à une défaillance cardiaque dû à une hypoplasie du myocarde ventriculaire. Un phénotype similaire est d'ailleurs observé dans les « syndromes de déficience fœtale en vitamine A » et suggère que *RXRα* est le principal gène *RXR* à être impliqué dans la transduction de la voie des rétinoïdes. La simple invalidation pour deux autres *RXR* ainsi que la mutation double *RXRβ,γ<sup>-/-</sup>* appuient cette hypothèse. En effet, ces mutants ne présentent pas de phénotype majeur même en présence d'un allèle *RXRα* invalidé supplémentaire (Krezel et al., 1996; Mark et al., 2009).

L'utilisation de mutants pour RAR et RXR simultanément a permis de confirmer leur fonctionnalité en tant que hétérodimères, car les phénotypes observés dans les simples mutants ainsi que des défauts supplémentaires sont présents (Kastner et al., 1997).





**Fig.25** : Absence de différenciation des cellules F9 en EPr et dérivés suite à l'invalidation de l'hétérodimère RXR $\alpha$ /RAR $\gamma$  (adapté et traduit de Chiba *et al.*, 1997b). A, B, C : cellules F9 sauvages, la différenciation en EPr par AR (B) et en PE par AR+AMPc (C) a lieu. D, E, F : cellules RXR $\alpha$ <sup>-/-</sup>/RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup> les cellules ne se différencient plus, ni en EPr (E), ni en PE (F).

## **IIC-4 Acide rétinoïque et développement murin précoce, études sur les modèles *in vitro***

Les différents phénotypes observés pour les simples et doubles mutants chez la souris sont essentiellement postimplantatoires. L'absence de défauts avant l'implantation n'exclut pourtant pas un rôle de la voie de signalisation des rétinoïdes dans les tout premiers événements de différenciation dans l'embryon murin. Les observations faites *in vivo* montrent en effet, qu'il existe de nombreuses redondances fonctionnelles entre les récepteurs RAR et entre les récepteurs RXR. De plus, entre E0 et E4.5, les ARNm et protéines maternelles peuvent encore jouer un rôle important dans l'embryon comme cela a été observé dans le cas de l'E-Cadhérine et de la  $\beta$ -caténine. Ce sont les modèles *in vitro* qui ont permis d'avoir une idée plus précise du rôle éventuel de l'AR à ces stades là et plus particulièrement au niveau de l'EPr.

### *IIC-3 a) Acide rétinoïque et cellules F9*

Les cellules F9 sont couramment utilisées dans l'étude de la différenciation en EPr. L'étude de mutations nulles pour différents hétérodimères RXR/RAR dans les cellules F9 a permis de montrer qu'ils sont différentiellement impliqués dans le contrôle de l'expression de gènes cibles de l'AR. Selon l'hétérodimère invalidé, différents gènes sont touchés (Chiba et al., 1997a). Par exemple, HNF1 $\beta$ , impliqué dans la différenciation du VE (Coffinier et al., 1999) est induit spécifiquement par le couple de récepteurs RXR $\alpha$ /RAR $\gamma$  (Chiba et al., 1997a). Le même groupe a montré que la mutation nulle du couple RXR $\alpha$ /RAR $\gamma$  empêche la différenciation des cellules F9 en EPr, VE ou PE (fig.25) (Chiba et al., 1997b). Les cellules F9 simple mutantes RAR $\alpha^{-/-}$ , RAR $\gamma^{-/-}$  et RXR $\alpha^{-/-}$  peuvent encore se différencier en VE, mais elles sont également incapables de donner du PE et résistent à l'effet antiprolifératif de l'AR (Chiba et al., 1997b).

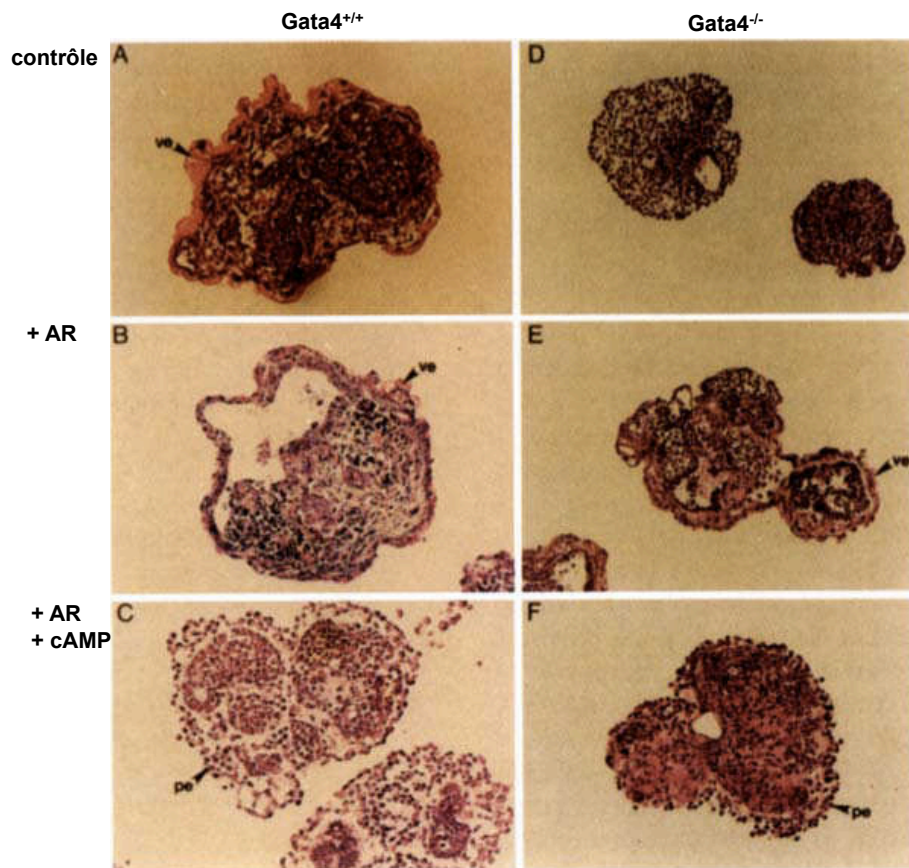
La différenciation des cellules F9 en EPr est caractérisée par l'apparition de structures des jonctions serrées, également observées au niveau du VE des CE. Les analyses par RT-PCR et par immunomarquages montrent que les molécules telles que ZO-1, l'occludine et les claudines 6 et 7 sont détectées à partir de deux à 4 jours de traitement par l'AR et augmente avec la différenciation (Kubota et al., 2001). De façon très intéressante, l'invalidation du



couple de récepteurs RXR $\alpha$ /RAR $\gamma$  empêche la formation des jonctions serrées. L'expression des protéines et des transcrits est perdue dans les cellules F9 RXR $\alpha^{-/-}$ /RAR $\gamma^{-/-}$  (Kubota et al., 2001). Ces résultats placent la signalisation par l'AR en amont de l'épithélialisation de l'EPr. Ces données mettent en avant l'importance de la signalisation des rétinoïdes dans la différenciation de l'EPr. L'hétérodimère RXR $\alpha$ /RAR $\gamma$  semble jouer le rôle principal dans la transduction du signal dans cette voie.

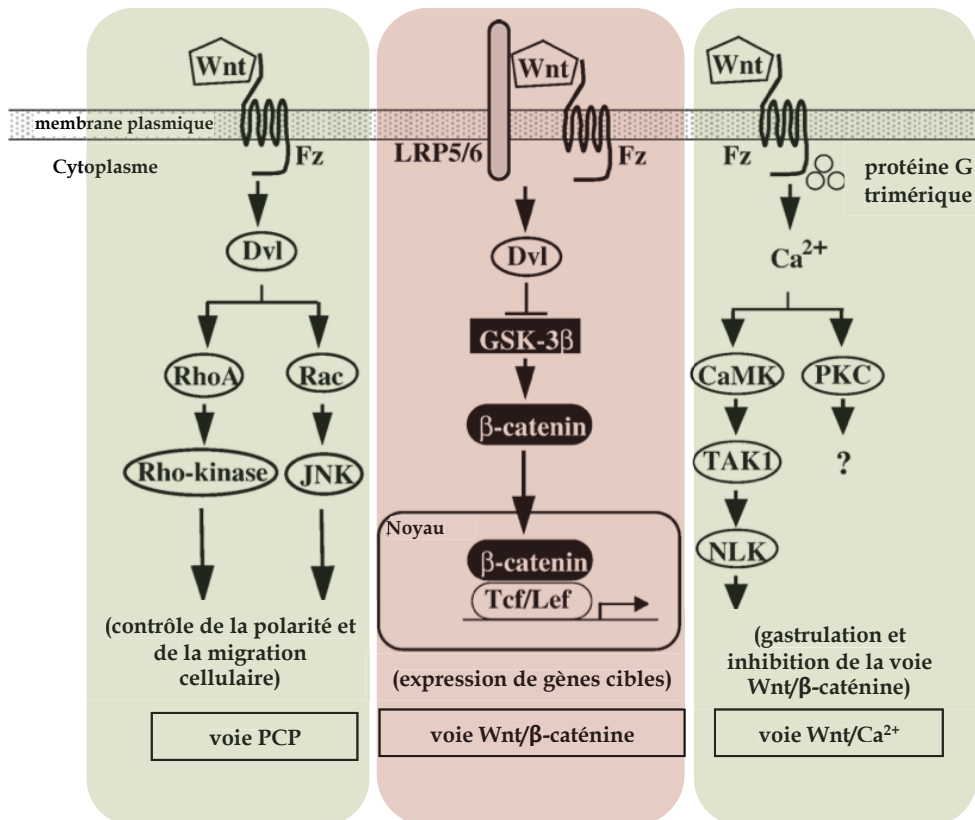
### *IIC-3 b) Acide rétinoïque et cellules ES*

Contrairement aux cellules F9, le traitement par l'AR de cellules ES n'induit pas seulement la différenciation en EPr, mais également en cellules ectodermes et mésodermes. Leur agrégation en culture forme des CE qui différencient à leur surface une couche d'EPr en absence d'AR. Cette couche d'EPr exprime de nombreux marqueurs spécifiques comme Gata6 et Gata4, la laminine, le Collagène IV, SPARC et Dab2 (Bielinska et al., 1999). L'expression ectopique de Gata6 et Gata4 dans les cellules ES est d'ailleurs suffisante pour induire leur différenciation en EPr même en présence de LIF (Fujikura et al., 2002). L'étude de différentes invalidations génétiques a permis d'établir une hiérarchie entre les gènes EPr-spécifiques. Alors que la présence d'EPr dans les CE mutants pour Gata4 peut être rétabli par addition d'AR en culture (Bielinska and Wilson, 1997), ce sauvetage est impossible dans le cas des CE Gata6 $^{-/-}$  (Capo-Chichi et al., 2005). Alors que l'AR induit l'expression de Gata6 dans les CE Gata4 $^{-/-}$ , mais ni Gata4 ni les autres marqueurs ne peuvent être induits dans les CE Gata6 $^{-/-}$  (Capo-Chichi et al., 2005). Gata6 est donc requis dans la différenciation en EPr induite par l'AR et se situe en amont de Gata4 dans cette voie, comme le confirment les expériences *in vivo* (Kuo et al., 1997; Morrissey et al., 1998). De plus, l'aggrégation des cellules Gata4 $^{-/-}$  n'est pas suffisante pour induire sa transcription (Capo-Chichi et al., 2005). Ni la surexpression de Gata4 dans les cellules ES Gata6 $^{-/-}$ , ni la surexpression de Gata6 dans les cellules ES Gata4 $^{-/-}$ , ne peuvent rétablir un phénotype sauvage avec la réexpression de marqueurs comme Dab2. En revanche, quand les cellules Gata4 $^{-/-}$  sont transfectées avec Gata5, l'expression de Gata6 est induite et Dab2 est exprimé. Gata5 peut prendre le relais de Gata4, mais pas de Gata6, car sa transfection dans les cellules Gata6 $^{-/-}$  ne rétablit pas l'expression de Dab2 (Capo-Chichi et al., 2005). L'AR peut induire Gata6 qui va permettre la différenciation de cellules de l'EPr en amont de Gata4. Gata4 qui réponds aux signaux d'aggrégation peut-être remplacé par Gata5 qui est également inductible par l'AR. Gata4 supprimerait l'expression de Gata6 par une boucle régulatrice négative alors



**Fig.26** : Absence de différenciation d'EPr et de ses dérivés à la surface des CE invalidés pour *Gata4* (traduit et de Bielinska et Wilson, 1997). A, B et C : CE sauvages ; D, E et F : CE *Gata4*<sup>-/-</sup> en absence d'AR il n'y a plus d'EPr à la surface des CE. L'addition d'AR rétablit le phénotype sauvage (E et F). Le VE et le PE, dérivés de l'EPr sont indiqués par des flèches.

que Gata6 stimulerait la transcription de Gata4 dans la différenciation en EPr (fig.26) (Capo-Chichi et al., 2005).



**Fig.27** : Les trois voies de signalisation WNT, la voie Wnt/β-caténine est surligné en rouge et les voies PCP et Wnt/Ca<sup>2+</sup> en vert (traduit de Kikushi *et al.*, 2007)

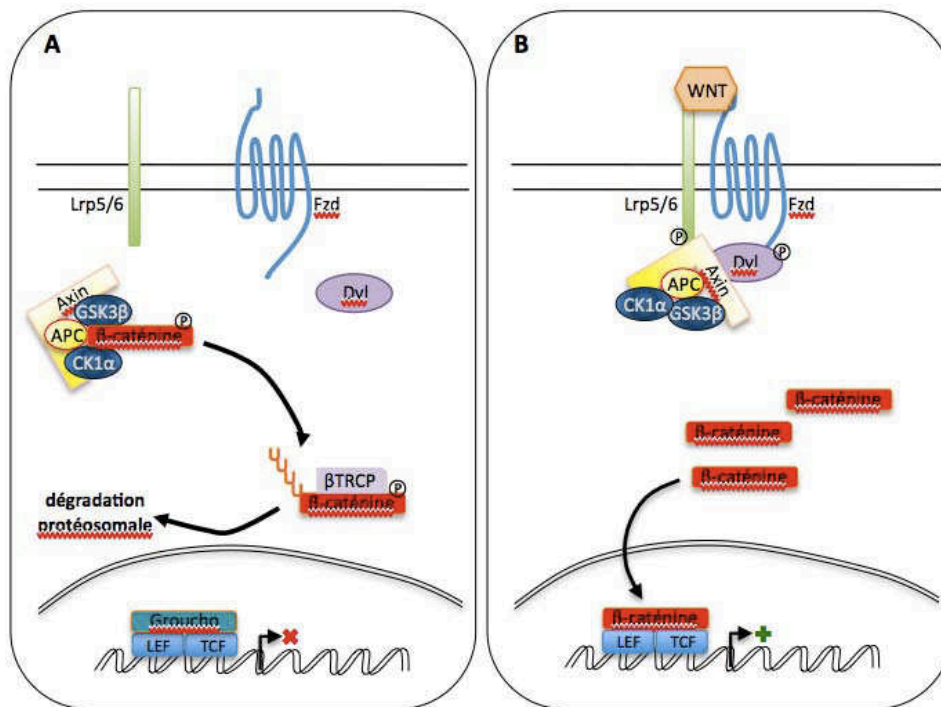
### III La signalisation Wnt

La signalisation WNT est une voie très conservée entre les espèces vertébrées et invertébrées. Elle est impliquée dans de nombreux événements au cours du développement et de la mise en place de pathologies telles que les cancers. La voie WNT agit au niveau de la différenciation, la prolifération et la polarité cellulaire.

En fait, il ne s'agit pas d'une voie unique, mais la signalisation WNT regroupe 3 voies majeures (fig.27), toutes activées par des ligands Wnt avec des effecteurs et une transduction distincts. Ces trois voies sont divisés en deux familles : la voie Wnt canonique ou Wnt/ $\beta$ -caténine et les voies non-canoniques ou  $\beta$ -caténine indépendantes. Les voies non-canoniques regroupent la voie PCP (**P**lanar **C**ell **P**olarity) et la voie Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ . La voie PCP, plus étudiée chez *Drosophila melanogaster*, joue, par exemple, un rôle dans la fermeture du tube neural et dans l'organisation planaire de la fourrure dorsale chez la souris (McNeill, 2009). L'activation de la voie Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  élève la concentration de calcium cytoplasmique et active les protéine-kinases CaMKII et PKC. Il semblerait qu'elle inhibe la voie Wnt canonique pour ainsi stimuler la migration cellulaire (Kikuchi et al., 2009).

Notons qu'en plus des sources bibliographiques classiques, il existe un site internet qui représente une base de donnée importante pour la signalisation Wnt : <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html> crée par Roel Nusse.





**Fig.28** : En absence de Wnt le complexe de destruction cytoplasmique composé de l'Axine, de l'APC et de protéine kinases, va phosphoryler la  $\beta$ -caténine cytoplasmique via l'action de CK1 $\alpha$  et GSK3. La  $\beta$ -caténine phosphorylée est ubiquitinylée en présence de la  $\beta$ -TRCP et dégradée par le protéasome. Ceci résulte dans un taux cytoplasmique faible en  $\beta$ -caténine. En parallèle les facteurs de transcription TCF/LEF sont liés à un co-répresseur Groucho, et il y a inhibition de la transcription des gènes cibles. Lorsque Wnt se lie sur son récepteur Frizzled (Fz) et co-récepteur Lrp5/6, la  $\beta$ -caténine est libérée du complexe de destruction après phosphorylation de Dvl et Lrp5/6 et recrutement de l'Axine à la membrane. L'accumulation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine va permettre sa migration dans le noyau où elle remplace le co-récepteur Groucho et permet l'activation de la transcription de gènes cibles en interagissant avec TCF/LEF en recrutant la machinerie transcriptionnelle

### ***IIIA La voie de signalisation WNT canonique (fig.28)***

Le modèle courant de la transduction du signal Wnt dans la voie canonique est le suivant ; En absence de Wnt le complexe de destruction cytoplasmique composé de l'Axine, d'APC (Adenomatous Polyposis Coli) et de protéine kinases, va phosphoryler la  $\beta$ -caténine cytoplasmique via l'action de CK1 $\alpha$  (Casein Kinase 1 $\alpha$ ) et GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3  $\alpha$  ou  $\beta$ ). La  $\beta$ -caténine phosphorylée est ubiquitinylée en présence de la  $\beta$ -TRCP et dégradée par le protéasome. Ceci résulte en un taux cytoplasmique faible de  $\beta$ -caténine. La  $\beta$ -caténine est également membranaire où elle participe dans les jonctions adhérentes avec les cadhérines. Dans le noyau, les facteurs de transcription TCF/LEF (T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor) sont liés à un co-répresseur Groucho, et il y a inhibition de la transcription des gènes cibles. Lorsque Wnt se lie sur son récepteur Frizzled (Fz) et co-récepteur Lrp5/6 (Low-density-lipoprotein Receptor-related Protein 5/6), la  $\beta$ -caténine est libérée du complexe de destruction après phosphorylation de Dishevelled (Dvl) et Lrp5/6 et recrutement de l'Axine à la membrane. L'accumulation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine va permettre sa migration dans le noyau où elle remplace le co-récepteur Groucho et permet l'activation de la transcription de gènes cibles en interagissant avec TCF/LEF en recrutant la machinerie transcriptionnelle (Gordon and Nusse, 2006; Grigoryan et al., 2008; Kikuchi et al., 2007).

#### **IIIA-1 les ligands Wnt**

Les Wnt sont une grande famille de facteurs de croissance hautement conservés. Leur nom est une contraction entre Wingless (Wg), l'homologue chez la drosophile, et Int-1 (van Amerongen and Nusse, 2009). Cette famille peut être divisée en deux selon leur capacité à induire la transformation de cellules épithéliales mammaires murines (Wong et al., 1994). Chez la souris il existe 19 gènes codant pour des ligands WNT. Les différents Wnt ont des profils d'expression divers et uniques et remplissent des fonctions variables au cours du développement (Kikuchi et al., 2009; van Amerongen and Nusse, 2009). Il est convenu que les Wnt avec une forte capacité transformatrice activent principalement la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. La majorité des gènes codant pour les 19 Wnt ont été invalidés génétiquement. Une partie de ces mutants nuls sont viables (Wnt2b, 5b, 6, 8a, 8b, 16). Les autres présentent des phénotypes développementaux plus ou moins sévères touchant principalement les systèmes



urogénitaux, la mise en place de l'axe antéro-postérieur et le développement du cerveau (Miller, 2002; van Amerongen and Berns, 2006). Vu le grand nombre de gènes *Wnt*, il n'est pas surprenant d'observer des redondances fonctionnelles. Par exemple, la mutation nulle double de *Wnt1* et *Wnt3a*, co-exprimés dans le tube neural dorsal en développement, entraîne des défauts importants, au niveau de la crête neurale, absents des mutants simples (Ikeya et al., 1997).

### **IIIA-2 Les récepteurs Frizzled et corécepteurs Lrp5 et Lrp6**

Les Frizzled (Fz) sont des récepteurs de la famille des GPCR (G-Protein-Coupled Receptors). Ce sont des protéines à sept passages transmembranaires exprimés à la surface des cellules sensibles aux Wnts. Dix gènes codants les Fz ont été identifiés chez la souris (Fz1 à Fz10). La partie N-terminale, extracellulaire, comporte le site d'interaction avec les ligands, riche en cystéines, CRD (Cystein Rich Domain). Les différents mutants présentent divers phénotypes incluant des défauts du système nerveux central (van Amerongen and Berns, 2006).

Les récepteurs Fz interagissent avec des co-récepteurs afin de transduire le signal Wnt. Ces co-récepteurs Lrp5 et Lrp6 font partie de la superfamille des « Low-density-lipoprotein receptor-related protein ». Il s'agit de protéines membranaires à un seul domaine transmembranaire. Deux membres de cette famille ont été identifiés comme jouant un rôle dans la transduction du signal Wnt : Lrp5 et Lrp6. Ces deux protéines ont des propriétés biochimiques très proches et sont majoritairement coexprimées au cours du développement et de la vie adulte (He et al., 2004). Les mutants nuls pour *Lrp5* sont viables et ne présentent que de légers phénotypes osseux et oculaires (Kato et al., 2002). En revanche, l'inactivation génétique de *Lrp6* entraîne des défauts plus graves, touchant, entre autres, le cerveau (Pinson et al., 2000). De façon intéressante, cette mutation phénocopie en partie celles de *Wnt1*, *Wnt3a* et *Wnt7* mettant en avant leur implication dans la voie Wnt canonique (He et al., 2004; Pinson et al., 2000). En effet, ils colocalisent in vivo et les phénotypes mutants sont moins extrêmes que ceux pour les ligands Wnt. La redondance fonctionnelle entre Lrp5 et Lrp6 explique le phénotype plus léger des embryons *Lrp5*<sup>-/-</sup>. Les doubles mutants *Lrp5/6*<sup>-/-</sup> qui meurent précocement, à la gastrulation, confortent cette hypothèse (Kelly et al., 2004). Il est maintenant démontré que Lrp5 et Lrp6 participent activement dans la transduction du signal



Wnt comme co-récepteurs avec les Fz. Ils lient les Wnt, au niveau de leurs domaines extracellulaires, et leur phosphorylation intracellulaire va entraîner le recrutement et la liaison de l'Axine et donc participer à la libération de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique (Mao et al., 2001; Tamai et al., 2004).

Différentes combinaisons de récepteurs Fz et ligands Wnt peuvent activer les trois voies Wnt. Vu la grande diversité de récepteurs (10) et surtout de ligands (19) de nombreuses interactions semblent possibles. Certains ligands tels que Wnt1 et Wnt3a sont considérés classiquement comme spécifique de la voie canonique alors que d'autres tel que Wnt5a sont considérés non-canoniques. Wnt1 et Wnt3a sont capables de lier la majorité des récepteurs Fz pour provoquer la phosphorylation de Dvl. En revanche, dans le modèle de cellules S2 de drosophile par exemple, uniquement Wnt3a induit la stabilisation de la  $\beta$ -caténine et sa migration nucléaire (Takada et al., 2005). La complexité de ces interactions devient évidente dans les expériences *in vitro* qui montrent que Wnt5a peut également activer la voie Wnt canonique en interagissant avec Fz4 et Lrp5 (Mikels and Nusse, 2006).

### **IIIA-3 Les principaux effecteurs de la voie**

#### **IIIA-3 a) Dishevelled**

Il existe 3 gènes murins codant pour des protéines Dishevelled (Dvl), une petite famille de phosphoprotéines cytoplasmiques (Gordon and Nusse, 2006). Malgré leur fonction démontrée et importante dans la transduction du signal Wnt canonique et non-canonique, le mécanisme via lequel ces protéines agissent est encore vague. Elles sont capables d'interagir avec un grand nombre de protéines de ces voies (Malbon and Wang, 2006). Il a été montré que les Dvl permettent d'inhiber des répresseurs de la signalisation Wnt après leur phosphorylation suite à l'activation de la voie par Wnt (Gordon and Nusse, 2006; Seto and Bellen, 2004).

#### **IIIA-3 b) Le complexe de destruction cytoplasmique**

Le complexe de destruction cytoplasmique regroupe quatre protéines qui interagissent en absence de Wnt afin d'inhiber la voie en promouvant la destruction de la  $\beta$ -caténine.



L'Axine tient un rôle d'échafaud liant la protéine suppresseur de tumeur APC (Adenomatous Polyposis Coli) et les protéine-kinases GSK3 $\alpha$  et  $\beta$  et CK1 $\alpha$ . Ce sont la GSK3 et la CK1 $\alpha$  qui phosphorylent la  $\beta$ -caténine ce qui entrainera sa destruction protéosomale. De façon intéressante, l'Axine semble également avoir un rôle dans l'activation de la signalisation. En effet, elle peut être recrutée par la partie cytoplasmique des Lrp5/6, ce qui serait même suffisant pour désinhiber la voie (Brennan et al., 2004).

### IIIA-4 Activation de la transcription des gènes cibles

L'invalidation de la  $\beta$ -caténine résulte en une létalité embryonnaire avec de graves défauts de la gastrulation (Haegel et al., 1995; Huelsken et al., 2000; Morkel et al., 2003). Ces embryons sont incapables de mettre en place l'axe antéro-postérieur. En effet, différents marqueurs des régions antérieures ou postérieures sont localisés distalement, tels que Cer-1 et Lim-1, ou perdus comme Otx2 et Gsc par exemple (Huelsken et al., 2000). Le DVE ne migre plus antérieurement et il n'y a plus formation ni de la ligne primitive, ni de mésoderme (Huelsken et al., 2000; Morkel et al., 2003). La signalisation  $\beta$ -caténine-dépendante joue ici à deux niveaux. Elle intervient dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur comme l'a été observé dans les mutants pour *Cripto* (Ding et al., 1998) et dont l'expression est d'ailleurs perdue dans les embryons  $\beta$ -caténine<sup>-/-</sup> (Morkel et al., 2003). La  $\beta$ -caténine est également requise dans l'induction de gènes spécifiques de la région de l'Epi proximal/postérieur tels que *Nanog* et *Fgf8* via la signalisation Wnt3 dans la formation du mésoderme (Morkel et al., 2003). En revanche, ces mutants présentent des jonctions adhérentes intactes grâce à la plakoglobine ou  $\gamma$ -caténine capables de remplacer la  $\beta$ -caténine dans l'adhérence cellulaire (Huelsken et al., 2000).

La stabilisation de la  $\beta$ -caténine par la création d'une protéine constitutivement active, déletée de son site de phosphorylation conduit au changement précoce de l'identité épiblastique (Kemler et al., 2004; Morkel et al., 2003). Les embryons « gain de fonction » pour la  $\beta$ -caténine expriment prématurément des marqueurs du mésoderme tels que brachyury et Snail dans l'épiblaste (Kemler et al., 2004; Morkel et al., 2003). Dans ces embryons l'axe antéro-postérieur est également perturbé. *Cripto* est exprimé, normalement postérieur, est exprimé ubiquitairement (Morkel et al., 2003).

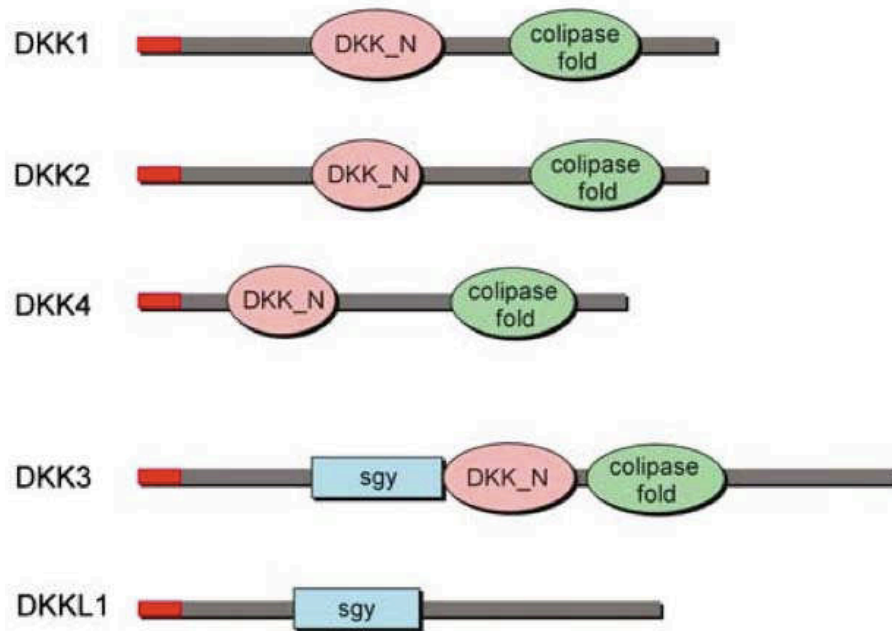
La mutation *Apc*<sup>min/min</sup> conduit à la troncation de son site de liaison pour la  $\beta$ -caténine donc à la stabilisation de cette dernière. L'analyse de ces mutants a mis en évidence des phénotypes





plus précoces que ceux décrits auparavant. La stabilisation de la  $\beta$ -caténine conduit ici à une accumulation cytoplasmique et nucléaire dans l'Epi et l'EPr dès E4.75 (Chazaud and Rossant, 2006). Ceci est accompagné par une expression ectopique de gènes cibles tels que *T* (*brachyury*) dans certains embryons à E3.5 (Chazaud and Rossant, 2006).

Il existe quatre gènes *Lef/Tcf* connus chez la souris : *Lef1*, *Tcf1*, *Tcf3* et *Tcf4*. Leur invalidation génétique entraîne différents phénotypes plus ou moins sévères retrouvés dans d'autres mutants pour la voie Wnt canonique. Pourtant, la ligne primitive n'est perturbée dans aucun des simples ou multiples mutants réalisés à ce jour (van Amerongen and Berns, 2006). Il doit donc exister des redondances fonctionnelles pas encore mises en évidence ou probablement un ou plusieurs autres facteurs de transcriptions inconnus pour le moment.



**Fig.29** : Structure des 5 membres de la famille DKK, Dkk1 à 4 partagent deux domaines riches en cystéines : le domaine DKK\_N spécifique de la famille et le domaine « pli de colipase » (« colipase fold »). Dkk3 et DkkL1 (ou Soggy) partagent un domaine Soggy (Niehrs, 2006).

### ***IIIB Les antagonistes sécrétés de la voie Wnt***

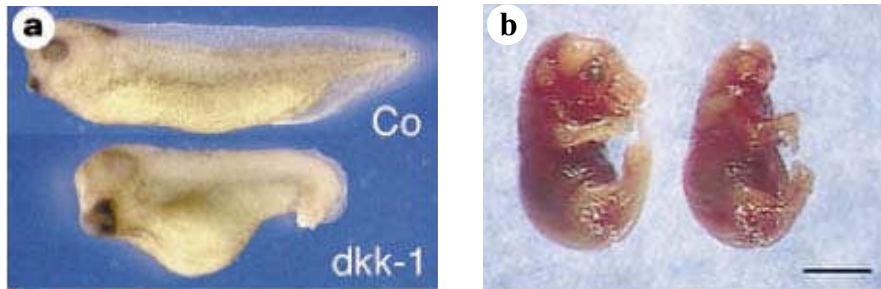
Les antagonistes sécrétés de la voie Wnt peuvent être divisés en deux grandes familles : les protéines sFRP (secreted Frizzled Related Protein) et les protéines Dkk (Dickkopf).

#### **IIIB-1 les familles sFRP et Dkk1**

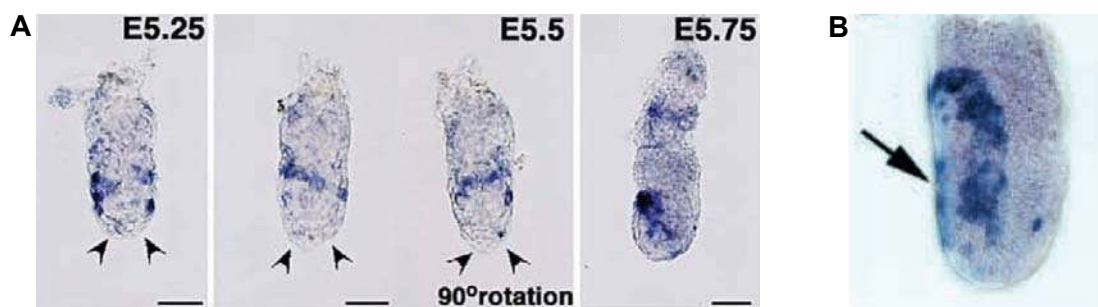
La famille des sFRP inclut les protéines sFRP, mais également WIF-1 et Cerberus. Les résultats observés pour Cerberus sont tous issus d'expériences *in vitro* et il n'existe pas d'évidence sur son rôle dans l'organisme. Ces inhibiteurs peuvent lier les ligands Wnt ou les récepteurs Fz et ainsi former des complexes non fonctionnels (Kawano and Kypta, 2003; Kikuchi et al., 2007). Ils bloquent donc la voie Wnt canonique et les voies non-canoniques. Les sFRP peuvent également jouer un rôle activateur notamment dans la diffusion du signal (Kawano and Kypta, 2003).

La famille Dkk, des glycoprotéines sécrétées, est composée de 5 membres : Dkk1 à 4 et Soggy, très proche de Dkk3. Les protéines Dkk portent toutes une séquence signal et deux domaines riches en cystéines spécifiques de la famille de part l'espacement et la séquence en acides aminés (fig.29) (Niehrs, 2006). Le domaine riche en cystéine en C-terminal est proche des plis de colipases présents dans de nombreuses protéines et pouvant servir de surface d'interaction protéine-protéine (Niehrs, 2006). Les protéines de la famille Dkk sont des antagonistes spécifiques de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, mais Dkk1 peut également jouer un rôle activateur sur la voie Wnt/PCP (Caneparo et al., 2007). En effet, ils exercent leur rôle en se liant spécifiquement aux corécepteurs Lrp5 et Lrp6 qui ne peuvent plus se dimériser aux Fz et transmettre le signal (Bafico et al., 2001; Kawano and Kypta, 2003; Mao et al., 2001). L'action sur la voie Wnt des Dkk est majoritairement négative, mais il a été observé la capacité d'activer la voie pour Dkk2 (Wu et al., 2000).

L'effet inhibiteur des Dkk et de Dkk1 plus particulièrement peut être potentialisé par les protéines Kremen. Elles sont capables de former un complexe ternaire avec Dkk1 et Lrp6 et induire leur endocytose (Mao et al., 2002). Ling et al. Montrent une expression dans la MCI de Kremen1 et Dkk1 dans les blastocystes (Li et al., 2008). Les souris simples et doubles



**Fig.30** : Caractérisation fonctionnelle de Dkk1 *in vivo* ; (a) l'injection d'ARNm de Dkk1 dans tous les blastomères d'un embryon de Xénope de 4 cellules induit une plus grosse tête, un tronc raccourci et une duplication partielle de l'axe corporelle (Glinka *et al.*, 1998) ; (b) l'invalidation de Dkk1 chez la souris inhibe les structures antérieures de l'embryon (Mukhopadhyay *et al.*, 2001)



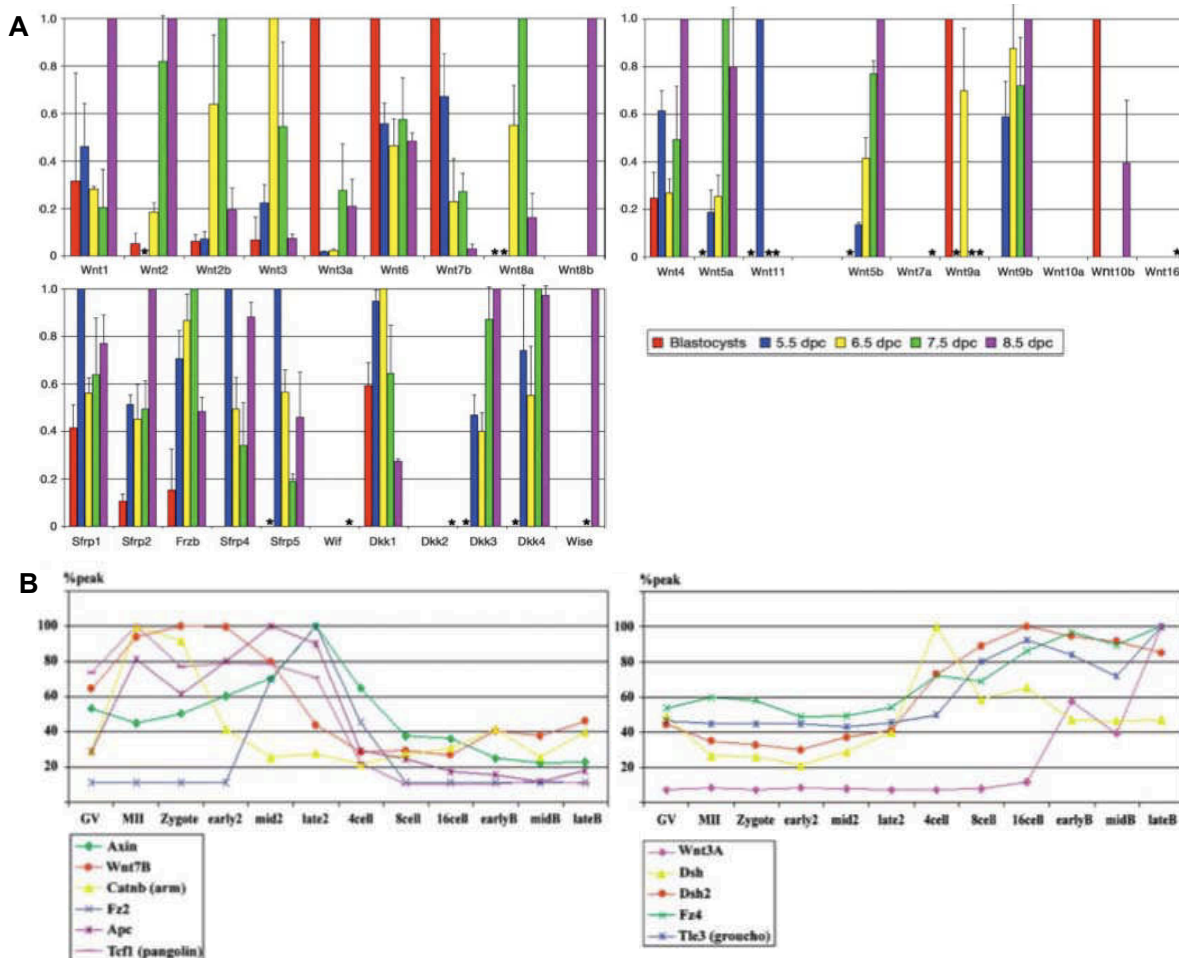
**Fig.31** : Expression *in vivo* de Dkk1 par hybridation *in situ* ; (A) profils d'expression entre E5.25 et E5.75, *Dkk1* est d'abord localisé dans l'endoderme viscéral puis migre antérieurement avec l'endoderme viscéral distal (Kimura-Yoshida *et al.*, 2005) ; (B) à E6.5, avant le début de la gastrulation, *Dkk1* est exprimé au niveau de l'endoderme viscéral antérieur, à l'opposé du point d'initiation de la ligne primitive (Perea-Gomez *et al.*, 2001)

mutantes pour *Kremen1* et *Kremen2* sont viables, fertiles et ne présentent pas de mortalité prématurée (Ellwanger et al., 2008). En revanche la signalisation Wnt augmente, confortant leur rôle dans son inhibition. C'est également le cas pour les doubles mutants *Kremen1/2*<sup>-/-</sup> hétérozygotes pour *Dkk1*. Les seuls phénotypes observés sont des doigts surnuméraires et une forte densité osseuse (Ellwanger et al., 2008). Les protéines Kremen sont donc dispensables dans une majorité de tissus pour l'inhibition de la voie Wnt via *Dkk1*.

## IIIB-2 *Dkk1*

*Dkk1* est le premier membre identifié de la famille Dkk. Son isolement et invalidation chez le Xénope a d'ailleurs donné le nom à la famille. En effet, la surexpression de *Dkk1* induit une grosse tête, « Dick-kopf » en Allemand (fig.30a) (Glinka et al., 1998). *Dkk1* est exprimé dans le DVE puis au niveau de l'AVE à l'opposé du point d'initiation de la ligne primitive (fig.31). De façon intéressante, la zone d'expression de *Dkk1* à E6.5 est en forme de fer à cheval (fig.31, B). Chez la souris, les mutants *Dkk1*<sup>-/-</sup> meurent suite à un défaut de spécification antérieure de l'embryon (fig.30b) (Mukhopadhyay et al., 2001). Les premiers défauts sont présents dès E7.5 avec la perte du marqueur antérieur *Hesx1* et l'absence de différenciation du neur ectoderme antérieur (Mukhopadhyay et al., 2001). Les embryons hétérozygotes *Dkk1*<sup>+/-</sup> présentent également des défauts avec une très légère diminution de la taille du cerveau, l'inhibition de la voie Wnt par *Dkk1* est donc dose-dépendante (Lewis et al., 2007). Les mutants *Otx2*<sup>-/-</sup> présentent aussi des défauts dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur et apportent des informations sur le rôle de *Dkk1* à ce stade. En effet, ces mutants spécifient le VE distal, mais celui-ci ne peut migrer antérieurement pour former le VE antérieur (Kimura et al., 2001; Kimura et al., 2000). De façon intéressante, l'expression de *Dkk1* est perdue dans ces embryons, mais l'expression de *Dkk1* au niveau du locus de *Otx2* rétablit la migration du DVE en AVE et indique que *Dkk1* est important dans l'induction de l'AVE (Kimura-Yoshida et al., 2005). L'absence de phénotype préimplantatoire dans les embryons *Dkk1*<sup>-/-</sup> est peut-être due à une redondance fonctionnelle, car *Dkk3* et *Dkk4* sont également exprimés dans l'embryon à ces stades là (Harwood et al., 2008).

De façon intéressante, il a récemment été montré que la fonction de *Dkk1* n'est pas restreinte à la voie Wnt canonique. En effet, chez le Xénope et le poisson zèbre, *Dkk1* peut interagir avec *Knypek*, un composant de la voie Wnt PCP, pour réguler les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation (Caneparo et al., 2007).



**Fig.32** : Expression par RT-PCR quantitative de différents acteurs de la signalisation Wnt au cours de l'embryogenèse précoce chez la souris ; (A) nombreux ligands agonistes et antagonistes de la voie sont exprimés dans le blastocyste (barres rouges) (Kemp *et al.*, 2005) ; (B) les molécules clés tels que Axine, APC, Dvl et  $\beta$ -caténine sont exprimées entre les stades ovocyte non fécondé et blastocyste tardif (Wang *et al.*, 2004)

## ***III C La voie Wnt canonique dans l'embryogénèse précoce***

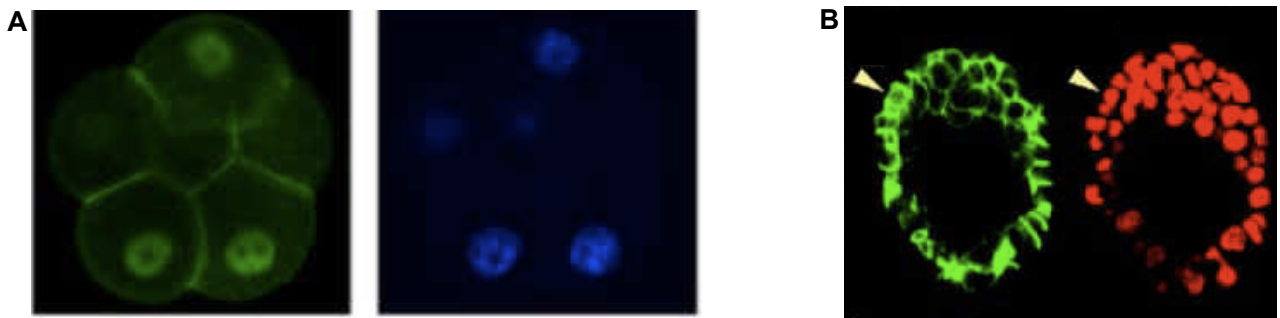
### **III C-1 Expression précoce des acteurs de la voie Wnt, *in vivo***

Il a été montré que la majorité des acteurs agissant dans la voie Wnt canonique sont exprimés au cours du développement préimplantatoire. Les expériences de RT-PCR quantitatives montrent que les ligands des voies canoniques et non-canoniques sont exprimés dès le stade blastocyste et ce au moins jusqu'à E8.5 (fig.32) (Harwood et al., 2008; Kemp et al., 2005; Kemp et al., 2007). Wang et collaborateurs ont également montré que l'expression d'autres acteurs comme l'*Axine*, APC, certains récepteurs, la  $\beta$ -caténine et Dvl est induite entre l'ovocyte non fécondé et le blastocyste tardif (fig.32b) (Wang et al., 2004).

En recoupant les résultats de ces différentes études on remarque quelques gènes exprimés préférentiellement dans les embryons entre les stades morula et blastocyste tardif. Il y a plus particulièrement les gènes codant pour les récepteurs Fzd3, 4, 5 et 6 et les gènes codant pour les co-récepteurs Lrp5 et 6 (Harwood et al., 2008; Kemp et al., 2007; Wang et al., 2004). Le ligand prédominant est très clairement Wnt3a, classiquement considéré comme canonique, mais également Wnt7b et Wnt6 (Harwood et al., 2008; Kemp et al., 2005; Kemp et al., 2007; Wang et al., 2004). *Dvl2* semble être le gène *Dishevelled* le plus exprimé à ces stades (Harwood et al., 2008; Na et al., 2007; Wang et al., 2004). Enfin, Dkk1 ressort comme le principal inhibiteur exprimé dans l'embryon préimplantatoire (Harwood et al., 2008; Kemp et al., 2005).

Les expériences classiques de lignées rapportrices de type TOP-Gal ou BAT-Gal n'ont pas permis de visualiser son activation *in vivo* (Currier et al., 2010; DasGupta and Fuchs, 1999; Maretto et al., 2003; Merrill et al., 2004). Elles expriment le gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur minimal (c-Fos) couplé aux sites de fixation des facteurs de transcription TCF/LEF (3 à 8 éléments de réponse). L'activation de la voie est visualisée grâce à ces rapporteurs dès E6.0 dans l'Epi postérieur à la jonction entre endoderme et ectoderme embryonnaire puis au niveau de la ligne primitive et du mésoderme extraembryonnaire (Maretto et al., 2003; Merrill et al., 2004). Une autre lignée rapportrice de la voie Wnt canonique utilise la région promotrice de l'*Axine2*. *Axine2* est une protéine faisant partie du complexe de destruction cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine et dont le promoteur





**Fig.33** : Expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine ; (A) La  $\beta$ -caténine, en vert, est nucléaire dans une partie des 8 blastomères de la morula, les noyaux sont marqués en bleu (Meilhac *et al.*, 2009) ; Une cellule trophoblastique porte la  $\beta$ -caténine, en vert, dans le noyau, en rouge (flèche) (Chazaud *et al.*, 2006 b)

et premier intron du gène possèdent des sites de liaison conservés pour TCF/LEF (Jho et al., 2002). Ces expériences montrent une activité de la voie dès E7.5 dans la région postérieure des embryons au niveau de la ligne primitive et de l'ectoderme embryonnaire postérieur (Jho et al., 2002). L'absence de signal peut effectivement être due à l'absence d'un signal Wnt ou le blocage de la voie, mais il n'est pas impossible que ces constructions ne soient pas assez sensibles pour détecter un signal.

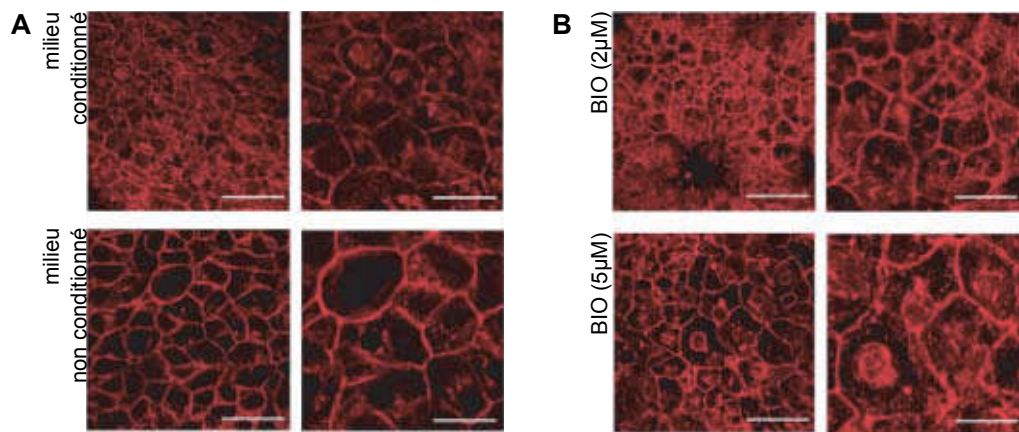
L'expression des trois protéines Dvl a été étudiée par immunomarquages. Jie Na et collègues montrent qu'ils sont exprimés dans les embryons préimplantatoires dès le stade 8 cellules et jusqu'à l'implantation (Na et al., 2007). Dans les blastocystes tardifs, Dvl2 semble être plus spécifiquement exprimé dans le TE alors que Dvl3 est localisé au niveau de la MCI et Dvl1 est quasi absent (Na et al., 2007). La surexpression des Dvl dans des embryons en culture entraîne l'augmentation de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique et l'extrusion des cellules affectées. De plus, ils observent un marquage ponctué, témoin d'une éventuelle activation de la voie, mais les embryons rapporteurs BAT-gal ne permet pas de la visualiser (Na et al., 2007).

L'absence de phénotype préimplantatoire observé dans la grande partie des mutants de la voie Wnt canonique peut être due aux nombreuses redondances fonctionnelles possibles (voir IIIA).

La localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine est témoin de l'activation et la fonctionnalité de la voie. Elle a pu être observé dans des embryons au stade 8 cellules (fig.33a) (Meilhac et al., 2009) et dans des cas isolés dans une cellule du TE face à l'EPr (fig.33b) (Chazaud and Rossant, 2006). L'inhibition de la destruction et donc la stabilisation de la  $\beta$ -caténine via l'inactivation d'APC conduit à des phénotypes préimplantatoires (Chazaud and Rossant, 2006). La voie peut donc être activée dans les embryons avant l'implantation.

### **IIIC-2 La voie Wnt dans les modèles *in vitro***

Les expériences *in vivo* ont montré que lorsque la signalisation Wnt est compromise par la perte de fonction du facteur TCF4, il y a perte des cellules souches épithéliales intestinales des cryptes du colon (Korinek et al., 1998). L'étude du rôle de la voie Wnt dans les cellules ES murines principalement a permis de mettre en évidence son probable rôle dans le maintien de la pluripotence ainsi que de l'autorenouvellement de ces cellules. L'activation de la voie, par l'invalidation d'APC et l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine ou par l'inhibition pharmacologique de la GSK3 $\beta$ , résulte dans une perte du potentiel de



**Fig.34 :** Expression de la  $\beta$ -caténine nucléaire dans les cellules ES humaines (Sato et al., 2004) ; (A) en milieu conditionné, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est active dans les cellules ES ; (B) l'inhibition spécifique de la GSK3 $\beta$  par BIO active la voie ( $\beta$ -caténine nucléaire) et permet le maintien de la pluripotence des cellules ES.

différenciation et le maintien de la pluripotence de ces cellules (fig.34) (Kielman et al., 2002; Sato et al., 2004). L'activation de la voie par Wnt3a permet l'autorenouvellement des cellules souches en milieu conditionné (Singla et al., 2006). Elle entraîne la hausse de gènes associés à la pluripotence tels que Stat3 (Hao et al., 2006) et la synergie entre ces deux voies, Wnt et LIF/Stat permet le maintien de la pluripotence (Ogawa et al., 2006). De plus, l'inhibition de la GSK3 $\alpha$  et  $\beta$  est un des éléments clés dans le maintien de « l'état de base d'autorenouvellement des cellules ES » en absence de facteurs exogènes où elle supprimerait toute différenciation résiduelle (Ying et al., 2008). Toutes ces données permettent d'établir l'hypothèse d'un rôle clé de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le maintien de la pluripotence des cellules ES et dans une certaine limite de l'Epi dont elles sont le modèle *in vitro*. Il faut noter que dans certains cas les cellules ES maintenues pluripotentes par l'activation de la voie Wnt canonique expriment T (Ying et al., 2008). Il est possible que ce maintien nécessite que d'infimes quantités de  $\beta$ -caténine et que lorsqu'un certain seuil est dépassé, il y a induction de la différenciation des cellules ES en mésendoderme.



## IV Raisonnements

Il n'est sans aucun doute que l'endoderme primitif et ses dérivés dont l'endoderme viscéral et pariétal sont d'une grande importance dans le bon déroulement du développement embryonnaire, que ce soit au point de vue nutritif que moléculaire. Dans l'équipe nous nous efforçons d'élucider les mécanismes qui sont impliqués dans la détermination et la différenciation de cet épithélium *in vivo*. Pour cela, les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse se sont axés autour de deux voies de signalisations importantes dans le développement embryonnaire.

### *IVA La voie de signalisation des rétinoïdes*

La voie de signalisation des rétinoïdes est une voie connue pour avoir de nombreuses fonctions tout au cours du développement d'un organisme vertébré et de son âge adulte. Malgré le fait qu'il n'existe aucune preuve de son activité aux stades préimplantatoires chez la souris, les données collectées pour les cellules de carcinome embryonnaire et les cellules souches embryonnaires sont encourageantes. J'ai donc pris en charge la mise au point dans l'équipe de la RT-PCR quantitative sur une cinétique de différenciation de cellules F9 pour caractériser l'évolution des marqueurs épiblastiques et endodermiques pendant la différenciation de l'EPr.

De premières expériences réalisées dans le laboratoire ont montré l'expression de certains récepteurs dans les embryons aux stades E2.5, E3.5 et E4.5 avec le profil caractérisé à E4.5. Mon objectif était donc de confirmer cette expression ainsi que de l'étendre au stade E3.5. J'ai de même entrepris la caractérisation de l'expression des enzymes de synthèse et de dégradation de l'acide rétinoïque (Aldh1a et Cyp26) dans les embryons préimplantatoires dans le but d'avoir une idée plus globale de la voie de signalisation à ces stades.



### ***IVB DKK1 : un inhibiteur spécifique de la voie WNT***

Le deuxième volet de ma thèse a été l'étude du rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Cette voie est largement représentée par l'expression de nombreux de ses acteurs au cours du développement préimplantatoire. Pourtant, son rôle in vivo est à ce jour encore inconnu. Les résultats obtenus sur les cellules souches embryonnaires et quelques mutants in vivo laissent penser qu'elle permettrait le maintien de la pluripotence et pourrait donc être important dans le maintien de l'épiblaste. Dkk1 est un inhibiteur spécifique de la voie. Il est exprimé dans le blastocyste et les résultats du microarray réalisé au sein de l'équipe l'ont identifié comme un potentiel marqueur de l'endoderme primitif. Les résultats préliminaires obtenus par François Gerbe ont confirmé les résultats du microarray. J'ai donc voulu approfondir la caractérisation de Dkk1 dans l'embryon préimplantatoire murin.





## Résultats et Discussion



# RESULTATS ET DISCUSSION

## I Etude de la voie des rétinoïdes

### *IA Présentation de l'étude d'expression sous forme d'article en cours de soumission*

#### **Components of the retinoic acid signaling cascade are differentially expressed in the mouse preimplantation embryo.**

##### **Introduction**

The implanting blastocyst, at embryonic day 4.5 (E4.5) is composed of three distinct cell lineages : the extraembryonic lineages trophectoderm (TE) and primitive endoderm (PrE) and the epiblast (Epi) (Yamanaka et al., 2006). TE and PrE are essential in nutrient exchanges have been shown to play an important role in the induction of the anterior-posterior axis (Ang and Constam, 2004 ; Arnold and Robertson, 2009). It has been shown by cell-lineage tracing that the ICM is formed of already determined precursors of the Epi (pre-Epi) and the PrE (pre-PrE) (Chazaud et al., 2006). These pre-Epi and pre-PrE cells are intermingled as shown by exclusive expression of specific markers Nanog and Gata6, Lrp2, Gata4 or Sox17 (Chazaud et al., 2006 ; Gerbe et al., 2008 ; Plusa et al., 2008 ; Yamanaka et al., 2010 ; Morris et al., 2010) and only form two distinct tissues at E4.5. Induction of precursors and segregation is still poorly understood. Recently it has been shown by activation and inhibition of the Fgf/RTK signaling that it plays an important role in maintaining the difference between Epi and PrE cells (Chazaud et al., 2006 ; Nichols et al., 2009 ; Yamanaka et al., 2010).

Retinoic acid (RA) is the active derivative of vitamine A (retinol). The retinoid signal is mediated through binding of RA to nuclear receptors (Mangelsdorf et al., 1995, Chambon, 1996 ; Kastner et al., 1997). Retinoic acid receptors are RARs ( $\alpha,\beta,\gamma$ ) and RXRs ( $\alpha,\beta,\gamma$ ). In absence of RA, the receptor heterodimers bind co-repressors such as NCoR and SMRT



(Bastien, Rochette-Egly, 2004). In the presence of RA, RAR bind to specific response elements (RAREs) in the promoter region of target genes and form heterodimers with RXRs. Activation of transcription is mediated by recruitment of a co-activator complex that acetylates histones and allows transcriptional activation.

RA is produced in two successive steps of oxidation (Niederreither, Dollé, 2008). The first, reversible, is mediated by alcohol/retinol dehydrogenases (ADH/RDH) (Duester et al., 2001 ; Duester, 2008). The second oxidation is irreversible. Retinaldehyde dehydrogenases (Aldh1a1, a2 and a3) convert retinaldehyde into RA (Duester et al., 2001 ; Duester, 2008). Cellular clearance of RA is thought to be majorly mediated by cytochrome P26 (Cyp26a1, b1 and c1) enzymes (Niederreither, Dollé 2008 ; Thatcher, Isoherranen, 2009).

Signalling through RXR/RAR is essential for correct development including differentiation, cell proliferation, apoptosis and organogenesis (Campo-Paysaa et al., 2008 ; Niederreither, Dollé, 2008 ; Dollé, 2009). Simple mutants of RA receptors are viable and only display tissue-specific defects, often close to those of VAD syndrom, what may be due to functional redundancies *in vivo* (Mark et al., 2009). Indeed double mutants for *RAR $\alpha$ / $\beta$* , *RAR $\alpha$ / $\gamma$*  and *RAR $\beta$ / $\gamma$*  or *RXR $\alpha$ /RAR* die in utero with severe malformations and developmental defects phenocopying VAD but also displaying supplementary phenotypes (Mark et al., 2009). Not only the receptor knock-out studies but also the genetic invalidation of metabolizing and catabolizing enzymes emphasize requirement of RA during development. Most of the different members of the retinoid signaling pathway display tissue specific expression patterns in mouse from E6.5 on (Ulven et al., 2000 ; Dollé, 2009) and its activity has been observed as early as E6.5 with RARE-lacZ reporters (Rossant et al., 1991 ; Ang et al., 1996). The RA-producing enzymes *Aldh1a* are first detected around E7.5 (Niederreither et al., 2002) whereas RA-degrading enzymes *Cyp26* expression has been shown at E6.25 (Uehara et al., 2009). Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) shows that *RAR $\alpha$* ,  *$\beta$*  and  *$\gamma$*  are expressed in the murine blastocyst (Huang et al., 2005). In the bovine embryo *RAR $\alpha$* , *RAR $\gamma$* , *RXR $\alpha$*  and *RXR $\beta$*  are expressed from the oocyte stage and throughout preimplantation development (Mohan et al., 2001 ; Mohan et al., 2002). First evidence of a possible function of RA in preimplantation development has been obtained in porcine and bovine embryos where it could influence embryo growth (Parrow et al., 1998 ; Rodriguez et al., 2006). However, no precise role has been described especially concerning cell lineage differentiation.

Other leads for the role of RA in early cell-lineage decisions come from *in vitro* studies on embryonal carcinoma (EC) cell lines and embryonic stem (ES) cells (Martin et al., 1990 ;

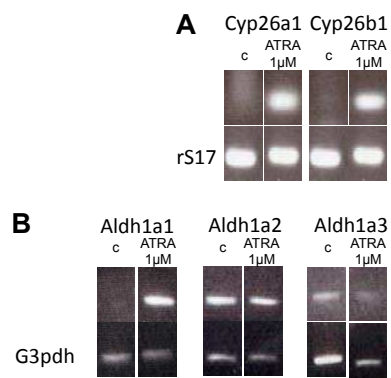


Fig. 1. Expression analysis of Cyp26 and Aldh1a in undifferentiated and differentiated F9 cells by semiquantitative RT-PCR. (A) Cyp26a1, b1 and c1 expression in pluripotent and RA treated F9 cells. (B) Aldh1a1, 2 and 3 expression in pluripotent (lane 3) and RA treated F9 cells.

Chiba et al., 1997 ; Chiba et al., 1998 ; Kubota et al., 2001 ; Shibamoto et al., 2004). Indeed, it is well known now that F9 EC cells are differentiating into PrE-like cells by RA administration to culture. Chiba and colleagues show that the double K.O. of *RXRα/RARγ* abolishes the differentiation of F9 EC cells into PrE by RA (Chiba et al., 1997). In these cells, PrE and epithelium markers such as ZO-1 are lost (Kubota et al., 2001). Moreover, in ES cells embryoid differentiation, RA can rescue the PrE phenotype of *Gata4*<sup>-/-</sup> and *Fgf4*<sup>-/-</sup> (Bielinska, Wilson 1997 ; Wilder et al., 1997). These experiments show that RA could act downstream of these factors.

Here we have analysed the expression patterns of different actors of the retinoid signaling pathway during the first cell lineage differentiations of the embryo. All the required enzymes and receptors are present during preimplantation to transduce a potential signal.

## Results

### *Expression of retinoid nuclear receptors and metabolism enzymes in F9 cells*

F9 EC cell lines differentiate into PrE in monolayer by RA treatment. It is well known that RA activates target gene expression through binding to its nuclear receptors RAR and RXR. It has been shown that inactivation of *RARα* or *RARγ* impaires this differentiation because double mutant *RXRα*<sup>-/-</sup>/*RARγ*<sup>-/-</sup> cannot form PrE (Chiba et al., 1997 ; Chiba et al., 1998). All *RARs* and *RXRs* are expressed in F9 cells treated or not with RA (Zelent et al., 1989 ; Wan et al., 1994 ; Chiba et al., 1997). To know whether the whole retinoid pathway is present in early embryogenesis and in vitro cell culture expression of metabolism enzymes in F9 cells was analysed. It has been shown that *Cyp26a1* is expressed in another EC line, P19 cells, where it is induced by RA treatment (Loudig et al., 2005). *Cyp26a1* and *b1* have also been shown to be induced *in vivo* in the forelimb bud by maternal administration of RA during gestation (Yashiro et al., 2004). Cells were treated with 1μM ATRA or vehicle and total RNA was extracted. RT-PCR was carried out for *Cyp26a1*, *b1* and *c1* and for *Aldh1a1*, 2 and 3 (fig.1). All *Cyp26* are expressed in differentiated F9 cells (fig.1A). *Cyp26a1* and *b1* are induced by RA (fig.1A). All *Aldh1a* are expressed in undifferentiated and RA-differentiated F9 cells (fig.1). Comparison between treated and untreated F9 cells shows strong induction of *Aldh1a1* by ATRA (fig.1B). The induction of *Aldh1a1* expression by RA has not been described so far and thus it is not known whether this induction is cell-type specific or not. Levels of *Aldh1a2* and *a3* expression were not changed by RA administration (fig.1).



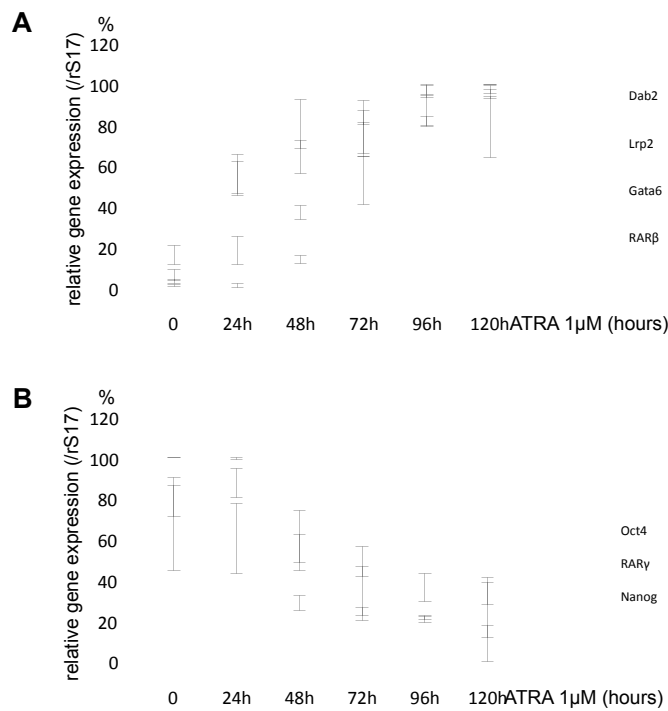


Fig. 2. Expression analysis of RAR $\gamma$  and RAR $\beta$  compared to PrE and Epi marker genes. (A) Expression of PrE markers Gata6 (blue), Lrp2 (red) and Dab2 (green) and the RA-induced gene RAR $\beta$  (purple). (B) Expression of Epi markers Oct4 (light blue) and Nanog (red) and retinoic acid receptor RAR $\gamma$  (green). (+/- sem)

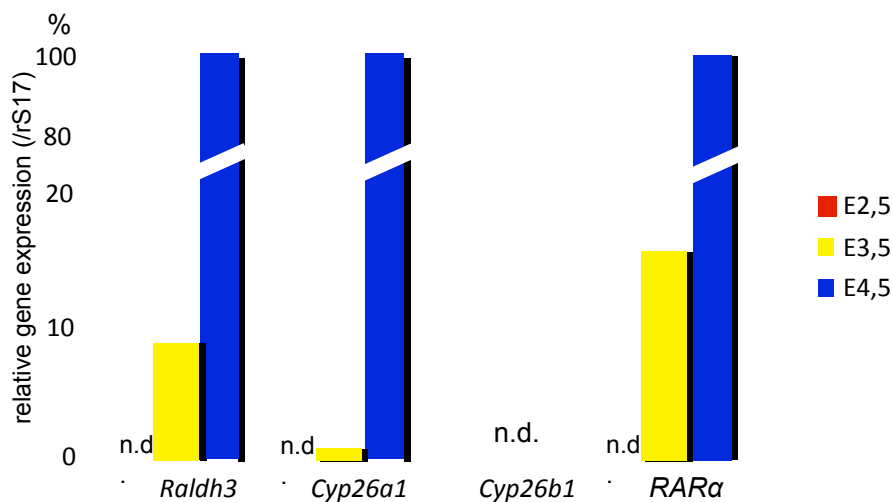


Fig. 3. Gene expression analysis (RT-qPCR) in preimplantation embryos. Tested are *Raldh3* (*Aldh1a3*), *Cyp26a1*, *Cyp26b1* and *RARα*. No expression could be detected for these genes in E2.5 embryos. Reference for calculation was E3.5. Relative expression is shown as % of maximal expression.

### *Expression of RAR $\beta$ and $\gamma$ through F9 differentiation*

To decipher a potential role of the retinoids during cell-lineage differentiation, F9 cells were differentiated with 1 $\mu$ M ATRA for 5 days. Total RNA were extracted every day of the kinetics and RT-qPCR was carried out. Relative gene expression was normalized against rS17 and day 0 of the assay. As RAR $\alpha$  expression does not change during F9 cell differentiation (Zelent et al., 1989 ; Martin et al., 1990), RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  kinetics of expression was examined. To better analyse the sequential steps of cell differentiation expression was compared to that of PrE markers Gata6, Lrp2 and Dab2 and Epi markers Oct4 and Nanog and (Morrisey et al., 1998 ; Koutsourakis et al., 1999 ; Gerbe et al., 2008 ; Yang et al., 2002 ; Nichols et al., 1998 ; Mitsui et al., 2003 ; Chambers et al., 2003 ; de The et al., 1989 ; de The et al., 1990). During the time course of differentiation PrE markers were induced whereas Epi marker expression decreased (fig.2). RAR $\beta$  expression is induced very rapidly from the first day. This induction is known to be direct via a very efficient RARE (de The et al., 1990). In the embryo Gata6 expression is first induced at E3.5 followed by Lrp2 at E3.75 and Dab2 at E4.0. In F9 cells PrE markers expression was induced in the same order. Indeed, Gata6 expression increased rapidly then Lrp2 and finally Dab2 expression was induced (fig. 2.A). Conversely Epi markers expression decreased with F9 differentiation (fig. 2.B). Oct4, although expressed in pre-PrE cells of the embryo (Chazaud et al., 2006), decreased rapidly. Indeed, Oct4 is negatively regulated by RA through a RARE localised in its promoter region (Schoorlemmer et al., 1994). Nanog peaked during the first day, then decreased rapidly. This increase in the first day of differentiation has already been observed in RA-driven chicken ES cell differentiation (Lavial et al., 2008) but its significance is unknown. Interestingly, RAR $\gamma$  expression during F9 differentiation was very similar to that of Nanog. An increase the first day of the kinetics could be observed, followed by an important decrease of expression. Thus, RAR $\gamma$  behaves like an Epi marker, following Nanog expression in PrE differentiation in F9 cells.

### *Expression of RAR $\beta$ and $\gamma$ , Aldh1a and Cyp26 in preimplantation embryos*

For further investigation of the retinoic acid signaling in early cell lineage decisions, RT-qPCR on preimplantation embryos was carried out. Embryos at characteristic stages E2.5 composed of 8 equipotent cells, E3.5 when PrE precursors are determined and E4.5 when the epithelial PrE is formed, were collected. The total RNA was extracted and reverse transcribed.

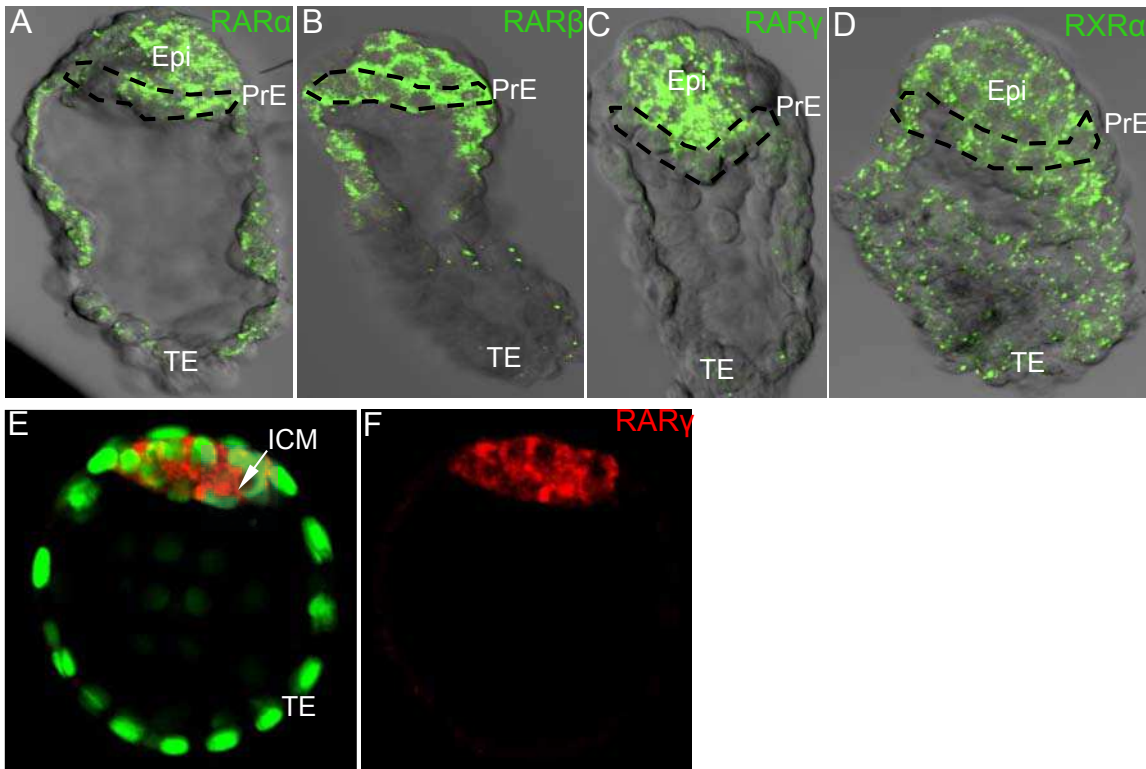


Fig. 4. Expression pattern of retinoic acid nuclear receptors *RARα*,  $\beta$  and  $\gamma$  and *RXRα* in E4.5 (A, B, C, D) and for *RARγ* E3.5 (E, F, G) embryos by in situ hybridisation. (A to D) mRNA is marked in green and merged with transmitted light images. PrE is marked with the dotted line. (E) nuclei (green) are stained with YOYO1.

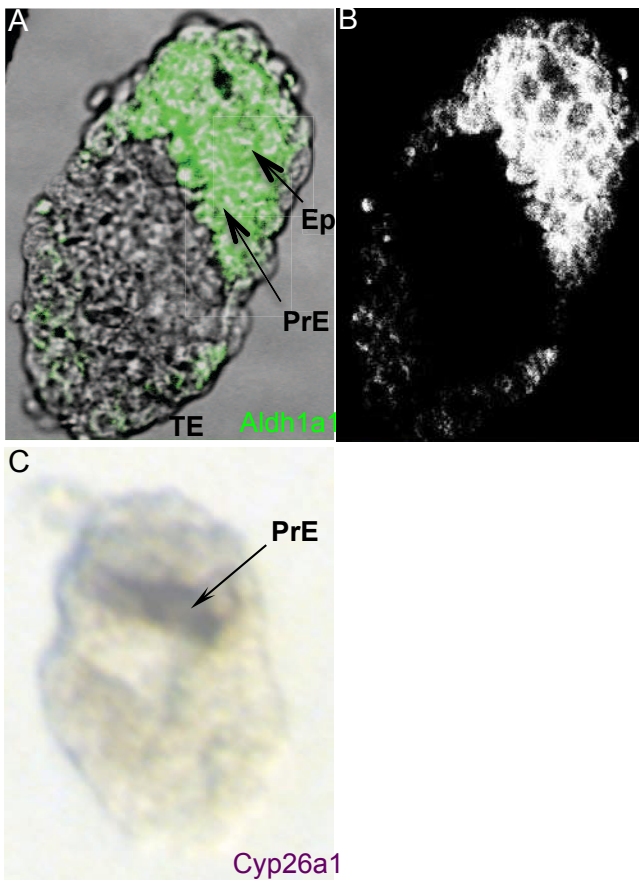


Fig. 5. Expression pattern of retinoic acid metabolism enzymes *Aldh1a1* and *Cyp26a1* in E4.5 embryos (I.S.H.). (A,B) *Aldh1a1* mRNA is localised in the Epi and PrE (black arrows) of E4.5 embryos. (A) merge of *Aldh1a1* signal (green) with transmitted light image. (B) *Aldh1a1* fluorescent signal. (C) NBT/BCIP staining of *Cyp26a1* mRNA is specifically localised in the PrE (black arrow).

cDNAs were used to quantify expression of receptors *RARα*, *Aldh1a1* and *a3* and *Cyp26a1* and the house-keeping gene *rS17* expressed homogeneously during early embryogenesis.

Relative quantification shows that at E2.5 no expression could be detected except for *rS17* (fig.3, n.d.). *Aldh1a3*, *Cyp26a1* and *RARα* are all expressed in the E3.5 embryos and their expression increases at E4.5 (fig.3). *Cyp26b1* is not expressed at any of these stages.

#### *mRNA localisation in the implanting blastocyst*

We examined mRNA expression of the genes presented above by fluorescent *in situ* hybridisation and laser scanning microscopy. Considering the importance of *RXRα* in development and mostly ubiquitous expression of *RXRβ*, we focused ISH experiments on *RARα*,  $\beta$  and  $\gamma$  and *RXRα*. *RARα* and *RXRα* were expressed ubiquitously in the E4.5 embryo (fig.4 A,D). *RARβ* was expressed in the Epi and PrE at this stage of development (fig.4 B). Interestingly, *RARγ* was exclusively expressed in the Epi (fig.4 C). *RARγ* expression was further analysed in E3.5 embryos to know whether the epiblastic expression follows *Oct4* or *Nanog* expression in the whole ICM or the Epi precursor cells respectively. *RARγ* was expressed in a subpopulation of ICM cells (fig.4 E,F,G) in a salt and pepper pattern as it has been observed by ISH for *Gata6* or *Nanog* (Chazaud et al., 2006). Double stainings with *Nanog* will show whether *RARγ* is expressed in Epi or PrE precursors. ISH stainings for *RARγ* are in agreement with RT-qPCR results. Indeed, *RARγ* expression behaves like *Nanog*'s in RA-induced PrE differentiation of F9 cells (fig.2).

We examined *Aldh1a1* and *Cyp26a1* expression to localize where, in the embryo, RA can be produced and degraded (fig.5). *Aldh1a1* was expressed like *RARβ* in both the Epi and PrE of E4.5 embryos (fig.5 A and B). *Cyp26a1* was found to be expressed exclusively in the PrE, consistent with its later expression in the VE (fig.5 C).

## **Discussion**

The aim of this study was to characterise the retinoid signaling pathway during preimplantation development and PrE formation. Numerous *in vitro* studies show its implication in PrE-like epithelial differentiation and results on porcine, bovine and murine preimplantation embryos suggest a RA activity in early development (Rodriguez et al., 2006 ; Huang et al., 2005 ; Parrow et al., 1998). Also, RA has been detected in maternal fluids and thus could act on the embryo (Parrow et al., 1998). Moreover, sporadic activation of RARE-



driven  $\beta$ -galactosidase activity can be detected as early as E3.5 in the ICM (Rossant et al., 1991). Our results complete previous studies and show that the retinoid signaling pathway can be active in the preimplantation embryo. Indeed the genetic cascade required for RA signaling can be reconstituted through the expression of its producing and degrading enzymes together with nuclear receptors.

We have confirmed *RAR* expression at blastocyst stage and shown their expression from E2.5 to E4.5. *RXR $\alpha$*  and *RXR $\beta$*  but not *RXR $\gamma$*  are also expressed at these stages. We have shown that *RAR $\alpha$*  and *RXR $\alpha$*  are expressed ubiquitously in the implanting blastocyst whereas *RAR $\beta$*  and *Aldh1a1* expression is localised in both Epi and PrE. A tentative link could be made between this RA producing enzyme and the RA sensitive receptor *RAR $\beta$* .

According to the action of RA in the PrE differentiation in F9 and ES cells we were expecting to find RARs specifically expressed in the PrE. This expression is in continuity with the later VE expression and might fulfill the same function of protecting the Epi from RA induction (Uehara et al., 2009).

Interestingly, *RAR $\gamma$*  mRNA is exclusively localised in the Epi cells at E4.5 and in a salt and pepper pattern at E3.5 behaving the same way as *Nanog* transcripts between E3.5 and E4.5. RT-qPCR on F9 differentiation by RA pointed out the parallel between the in vitro cell-model and lineage-specific marker expression. Especially, an important similarity between *RAR $\gamma$*  and *Nanog* expression in this system in agreement with ISH stainings in vivo.

If in vivo RA acts through the *RXR $\alpha$* /*RAR $\gamma$*  dimer for PrE differentiation, it must be non cell-autonomous. In that case RA would activate the transcription of a gene coding for a secreted factor driving differentiation of adjacent cells. An example of such a mechanism is Fgf signaling, as *Fgf4* is expressed in the ICM (Goldin, Papaioannou, 2003) but drives differentiation of PrE (Feldman et al., 1995 ; Wilder et al., 1997). Indeed, it has been shown that F9 cell differentiation into PrE requires phospho-ERK signaling (Verheijen et al., 1999). It would thus be interesting to look at the influence of RA on Fgf signaling activity both in vitro and in vivo. Recent data show that ES cell differentiation by RA is first caused by an increase of phospho-ERK. This is confirmed by blocking with Fgfr inhibitors. However only neural and epiblast markers were examined in that study and it would be interesting to know how PrE markers are behaving (Stravidis et al., 2010). Interestingly, *RAR $\gamma$*  specific expression in the Epi could mediate the transition towards neural differentiation described in that study (Stravidis et al., 2010).

If the *RXR $\alpha$* /*RAR $\gamma$*  is not the functional, what other nuclear receptor could substitute for this heterodimer in vivo? *Nr2f1* and 2 are interesting candidates. They have recently been shown



to bind RA (Kruse et al., 2008). Nr2f1/2 can dimerize with RAR or RXR and interfere with the retinoïd pathway (Cooney et al., 1992 ; Kliewer et al., 1992 ; Lin et al., 2000 ; Ben-Shushan et al., 1995). In preimplantation development *Nr2f1/2* are expressed at E3.5 and E4.5 as shown by RT-PCR and microarray (Murray, Edgar, 2001 ; Gerbe et al., 2008). Staining of mRNA in embryoid bodies shows expression in the outer PrE-like epithelium (Murray, Edgar, 2001). It may thus be possible that, in vivo, Nr2f1/2 activates transcription of genes driving PrE differentiation through binding of RA together with RARs or by their own.

It is clear that functional studies are required in order to further elucidate retinoïd pathway activity. Activation and inhibition by specific antagonists with subsequent marker gene expression analysis are currently carried out in our group.

## **Materials and Methods**

### *Embryos*

CD1 embryos were collected by flushing (E2.5, E3.5) or dissecting (E4.5) the uterus. For staging, noon of the vaginal plug was considered as E0.5. Embryos were collected as described earlier (Gerbe et al., 2008) at E2.5, E3.5 and E4.5.

### *Cell culture*

F9 cells were cultured in DMEM F12 medium (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco), glutamine and antibiotics (penicilin/streptomycin 50µg/mL, Gibco). Cells were differentiated into primitive endoderm-like cells by 10<sup>-6</sup>M all-trans retinoic acid (ATRA, Sigma). ATRA was diluted in ethanol or DMSO. Differentiation was carried out five days and total RNA was extracted every day.

### *RNA extraction and Reverse Transcription*

For F9 cells, total RNA was extracted with Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. For embryos, about 130 embryos at E2.5, 80 embryos at E3.5 and 20 embryos at E4.5 were pooled and total RNA was isolated with the RNeasy Micro kit (Qiagen). For embryos, entire total RNA of pooled embryos was subjected to first-strand cDNA synthesis using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), for cells, 1µg of total RNA was used for reverse transcription.



<b>gene</b>	forward (5'-3')	reverse (5'-3')
<i>Cyp26a1</i> <sup>b</sup>	agcagcgaagaagggtgatt	tagccactgctccagacaac
<i>Cyp26b1</i> <sup>b</sup>	cgctacctggactgtgtcat	ggatctggaaaccatccagt
<i>Dab2</i> <sup>*</sup>	gacttgcttgcttcagacat	ttactgggaccgtacctaga
<i>Gata6</i> <sup>*</sup>	gccaaactgtcacaccacaac	tgttaccggagcaagcttt
<i>Lrp2</i> <sup>*</sup>	acaaggtttgcggtgtcttt	cccctccatctccttctctt
<i>Nanog</i> <sup>*</sup>	aagtacctcagcctccagca	gtgctgagcccttctgaatc
<i>Oct4</i> <sup>*</sup>	cacgagtggaaagcaactca	agatgggtggtctggctgaac
<i>Aldh1a3</i> <sup>b</sup>	cgaagagtgcgaaccagtta	cttgggtgaacttgacctcca
<i>RARα</i> <sup>b</sup>	atcgagacccagagcagcag	cctgggtgcgctttgcgaacc
<i>RARβ</i> <sup>*</sup>	cggagagatcatgtttgact	ctcgatggattgagcagtat
<i>RARγ</i> <sup>*</sup>	tcctcgggtctataagccatgctttg	ttggacatgccacttcgaaacac
<i>rS17</i> <sup>*b</sup>	atgacttcacaccaacaagc	gccaaactgtaggctgagtgac

Table 1 : Primers used for RT-qPCR on F9 cell differentiation kinetics and preimplantation embryos. Hybridisation temperature of primers was set at 55°C (\*) or 60°C (<sup>b</sup>).

### RT-PCR

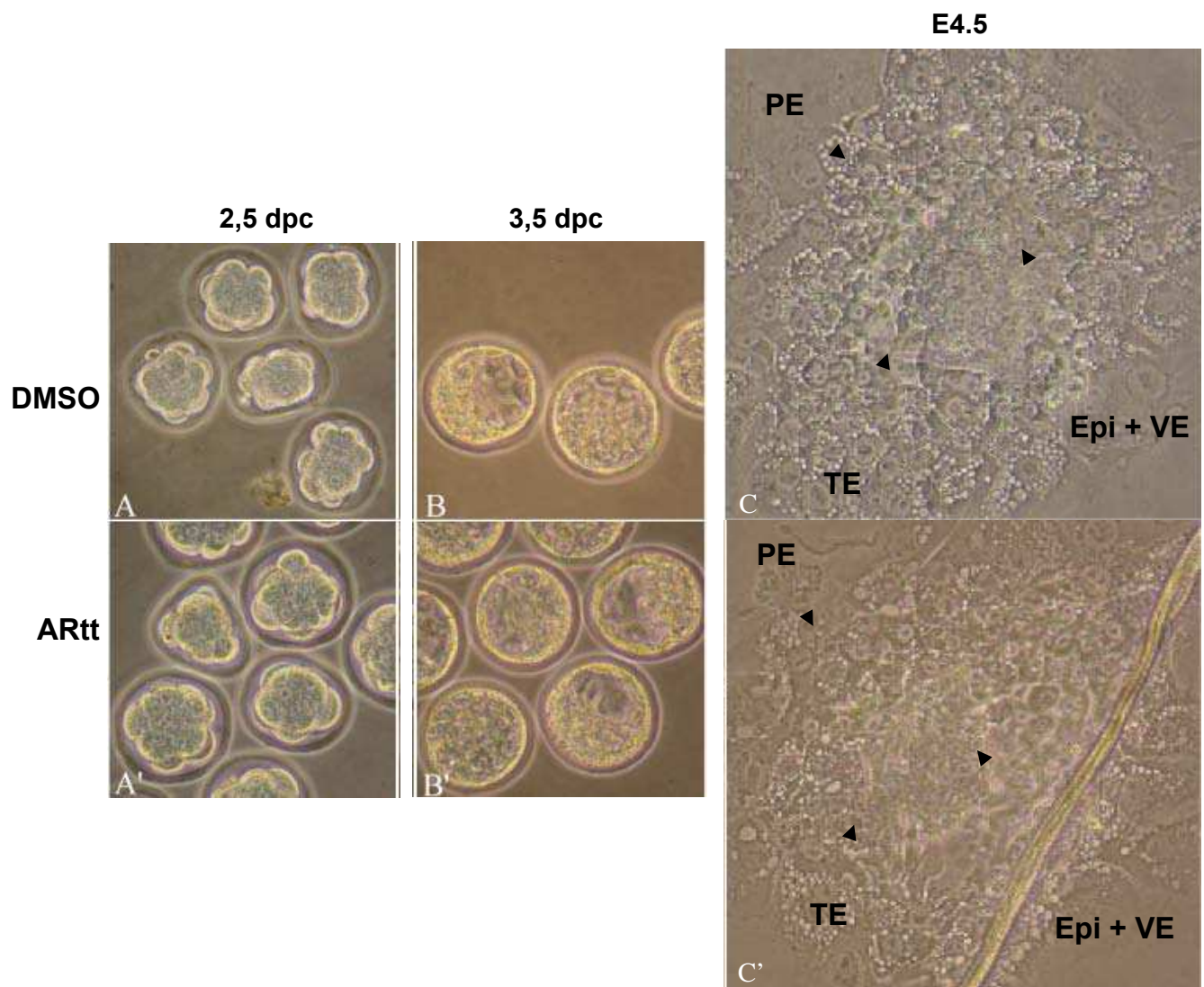
Freshly synthesized cDNA (2,5% of RT product), was used for gene specific amplification :  
*rS17* 5'atgactccacaccaacaagc3' and 5'gccaaactgtaggctgagtgc3' ; *G3pdh* 5'accacagtccatgccatca3' and 5'tccaccaccctgttgctgt3' ; *RARα* 5'gaagaaagaggcacccaagc3' and 5'ggacgatgctgagactggactgctc3' ; *RARβ* 5'ctcgtcccgagcccaccatctccact3' and 5'gaggtcgtctagctccgctgtcatctc3' ; *RARγ* 5'ctcatcaccaaggcagcaaagcc3' and 5'cagcccatccgagaatgtcatagt3' ; *RXRα* 5'ccttctcccaccgctccata3' and 5'ccttctcccaccgctccata3' ; *RXRβ* 5'gcgacacccccattgacacc3' and 5'cagatggggcagaggaggga3' ; *RXRγ* 5'gccgagagcgagcagagagt3' and 5'cctgtccccaatgtgatg3' ; *Aldh1a1* 5'gccagcagagcaaactcct3' and 5'tcgtcaacactcctttca3' ; *Aldh1a2* 5'tgggagagaaatgggtgagt3' and 5'atcgtggacaggcaggttat3' ; *Aldh1a3* 5'aatgtctgggaatggcagag3' and 5'cactttccccctcagaacaa3'

### Quantitative RT-PCR

cDNA equivalent of 5 embryos at E2.5, 3 embryos at E3.5 and 1 embryo at E4.5 was used per well. Reactions were done with the *Power SYBR®* Green PCR System (Applied Biosystems) as triplicates in a total volume of 25µL per well. qPCR was performed with primer annealing at 60°C on the Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System. All qPCR runs included a reference gene, *rS17*, expressed at a similar levels throughout preimplantation development. The threshold was determined automatically and Ct values were exported to Microsoft Excel for analysis. The relative expression ratio  $\Delta\Delta C_t$  of target genes was calculated according to Pfaffl (2001), and standardised against the references : *rS17* (Lavial et al., 2008) and timepoint E2.5. Relative expression levels were presented as a percentage of maximal expression. Primer sequences were obtained from previous studies (Romand et al., 2006 ; Su, Gudas, 2008, Lavial et al, 2008) or designed with Primer3 if possible intron-spanning. Primers used for RT-qPCR are listed in Table1.

### In situ Hybridization (ISH)

ISH was performed as previously described (Chazaud et al., 2006). Plasmids were kindly provided by Pascal Dollé (IGBMC, Strasbourg, France) for the retinoic acid receptors probes, by M. Petkovich (CRI, Kingston, Canada) for the *Cyp26* probe and by L. Attisano (HSC, Toronto, Canada) for the *Aldh1a* probe.



**Fig.36 :** Traitement d'embryons en culture par ARtt. Le traitement par ARtt d'embryons mis en culture à E2.5 et jusqu'à équivalent E4.5 ne modifie pas la morphologie des embryons. Tous les types cellulaires des embryons témoins sont distinguables dans les embryons traités (résultats non publiés, Valérie Borel).

### ***IB Effet de l'AR en culture d'embryon***

Des expériences de culture d'embryon en présence d'AR ont été réalisées. Les embryons prélevés à E2.5 sont mis en culture en présence ou absence d'AR dans du M16 puis du RPMI complétement. L'administration d'AR en culture ne change pas la morphologie des embryons à équivalent E3.5 ni à équivalent E4.5 (fig.35). En effet, les embryons se développent comme les contrôles. Ils sont capables de caver et on distingue morphologiquement les cellules du PE, TE, de l'Epi et du VE (fig.35 C et F).

De premières cultures d'embryons en G-2 avec l'AR montrent qu'il n'y a pas de changement important dans la survie des embryons. En effet, après 24h de culture, à équivalent E3.5, la survie est de 79,7% pour les embryons contrôles (N=79) et de 79,3% pour les embryons cultivés en présence de 1 $\mu$ M d'AR.

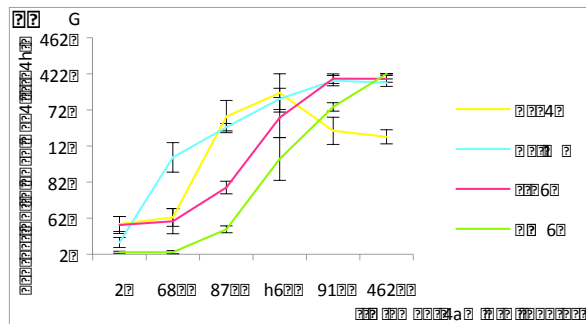
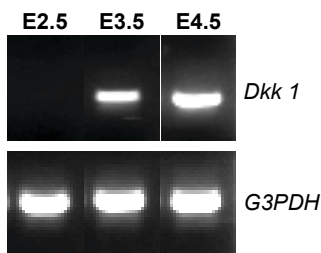
Il sera intéressant d'analyser l'expression de marqueurs de l'EPr et de l'Epi dans les embryons après traitement par l'AR. L'expression sera analysée par RT-qPCR et marquée sur les embryons. Il est possible que l'AR induira des changements au niveau moléculaire qui ne peuvent être observés morphologiquement. Ceci permettra de tester si l'AR est capable d'influer sur l'identité cellulaire aux stades préimplantatoires.

**Supplementary Table 2.**

Early and late embryonic expression profiles of 271 probes with enriched expression in Xen cells relative to TS and ES cells.

		E2.5	E3.5	E4.5	E4.75	E5.5	E6.0
H3025G11	Dkk1	0,00	0,33	0,87	1,11	0,55	0,71

22



**Fig.36** : Expression de *Dkk1* (ARNm) dans l'embryon préimplantatoire. (A) les résultats de microarray montrent que *Dkk1* est enrichi dans les cellules XEN et à partir de E3.5 dans l'embryon (Gerbe et al., 2008). (B) *Dkk1* est exprimé dans les embryons à E3.5 et E4.5 (F.G., RT-PCR non publié). (C) *Dkk1*(jaune) est induit rapidement au cours d'une cinétique de différenciation de cellules F9 en EPr par l'AR, comparé à l'expression de *Gata6* (bleu), *Lrp2* (rouge) et *Dab2* (vert).

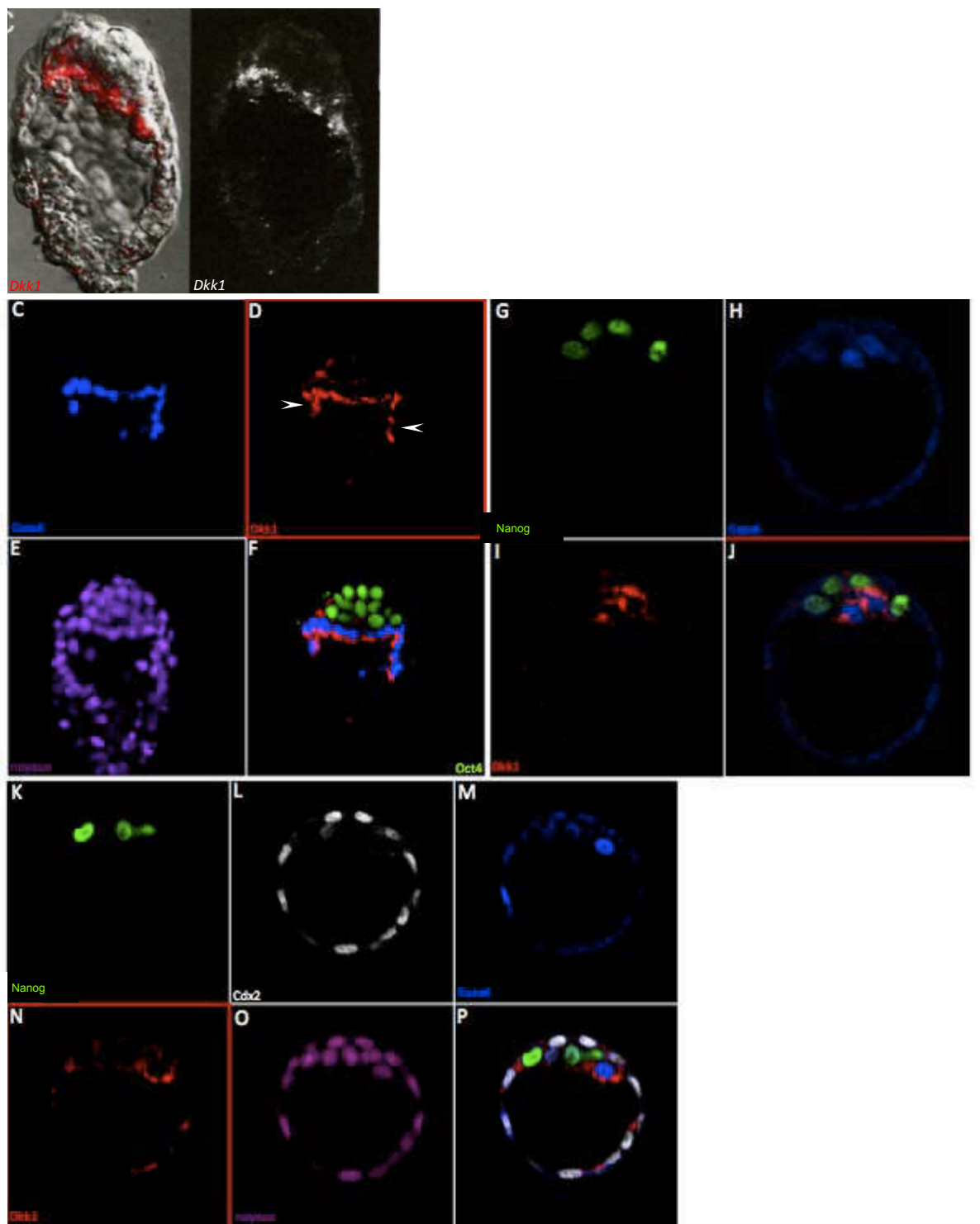
## II Etude du rôle de voie Wnt canonique dans la différenciation de l'EPr

### *IIA Etude de l'expression de Dkk1 in vivo et in vitro*

Au cours des 5 dernières années, différentes études ont montré que la majorité des membres de la voie de signalisation Wnt canonique sont exprimés au cours de l'embryogenèse préimplantatoire (Wang et al., 2004 ; Kemp et al., 2005 ; Kemp et al., 2007 ; Harwood et al., 2008). Dkk1 est un inhibiteur sécrété de cette voie (Glinka et al., 1998), mais peut également avoir une fonction activatrice de la voie Wnt/PCP chez le poisson zèbre (Caneparo et al., 2007). Dkk1 a été identifié comme un marqueur potentiel de l'EPr. L'analyse transcriptionnelle de cellules isolées de l'ICM montre que *Dkk1* fait parti du « PrE cluster » (Kurimoto et al., 2006). De plus, dans le microarray réalisé dans l'équipe, son expression est enrichie dans les cellules XEN comparativement aux cellules ES et TS ainsi que dans les embryons à E3.5 et E4.5 (fig.36 A, Gerbe et al., 2008). Les RT-PCR semi-quantitatives confirment l'expression de *Dkk1* à E3.5 et E4.5 et son absence à E2.5 (fig.36 B). De façon intéressante, l'étude de son expression au cours de cinétiques de différenciation de cellules F9 en EPr par l'AR montre qu'elle est induite rapidement après *Gata6*, entre 24 et 49 heures de traitement (fig.36 C).

L'hybridation *in situ* montre que l'ARNm de *Dkk1* est spécifiquement localisé dans les cellules de l'EPr à E4.5, à l'interface de l'Epi et de la cavité blastocœlique (fig.37 A et B). La protéine Dkk1 est également localisée dans l'EPr (fig.37 C à F). La co-expression avec *Gata6* prouve que Dkk1 est effectivement un marqueur de l'EPr à E4.5 (fig.37 F). On peut noter que Dkk1 est également exprimé dans les cellules d'EPr qui ont commencé à migrer le long du TE à E4.75 et qui formeront plus tard le PE (fig.37 D et F, flèches). De plus, l'expression de Dkk1 est polarisée. Effectivement, elle est localisée au pôle apical des cellules épithéliales endodermes (fig.37 D et F).

A E3.5, Dkk1 est exprimée selon un profil en poivre et sel au sein de la MCI (fig.37 I et N). Toutes les cellules exprimant Dkk1 expriment également *Gata6* (fig.37 H,I,J et M,N,P ; fig.38 B). Dkk1 est donc un marqueur des précurseurs de l'EPr. En revanche, les cellules exprimant *Gata6* n'expriment pas toutes Dkk1 (fig.38 B). En effet, le nombre de cellules qui expriment



**Fig.37** : Profil d'expression de *Dkk1* dans l'embryon préimplantatoire. (A,B) marquage de l'ARNm de *Dkk1*(rouge) au niveau de l'EPr à E4.5. (C,D,E,F) Expression de *Dkk1* dans l'EPr et le PE à E4.75 (D, flèches blanches). (G à P) immunofluorescence à E3.5. *Dkk1* (I, N, rouge) est co-exprimé avec *Gata6* (H, M, bleu) mais pas avec *Nanog* (G, K, vert). Les noyaux sont marqués au DAPI (E, O, violet).

Dkk1 augmente avec la croissance de l'embryon et au sein de la population de cellules exprimant Gata6 (fig.38 A). Dans 4 embryons nous avons pu observer 1 cellule exprimant Dkk1 et Nanog, mais également Gata6 (fig. C, 4/11 embryons, 4/237 cellules comptées). Dkk1 n'est donc jamais co-exprimé avec Nanog seul et l'expression de Dkk1 est toujours associée à celle de Gata6 entre E3.5 et E4.75.

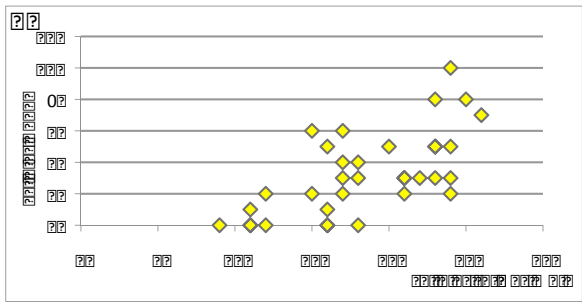
## ***IIB Discussion sur l'expression et la fonction de Dkk1 dans la différenciation de l'EPr***

L'hybridation in situ et les immunomarquages montrent que Dkk1 est un marqueur des précurseurs de l'EPr. Il est exprimé dans une partie des précurseurs de l'EPr et le nombre de cellules exprimant Dkk1 augmente au sein de cette population. Ceci a déjà été observé pour d'autres marqueurs comme Lrp2, Gata4 et Sox17 (Gerbe et al., 2008 ; Plusa et al., 2008) montrant que les pré-EPr mûrissent tout au long du jour 3.5. Enfin, à E4.5 Dkk1 est exprimé dans toutes les cellules de l'EPr de façon polarisée au pôle apical de l'épithélium. On peut remarquer un parallèle pour Dkk1 et Lrp2 entre les résultats de RT-qPCR et d'immunomarquages. En effet, leur expression est induite le même jour de la cinétique de différenciation des cellules F9, mais celle de *Dkk1* augmente plus rapidement. De plus, les comptages de cellules exprimant Dkk1 dans la MCI montrent également une augmentation du nombre de cellules plus rapide que ce qui a été observé pour Lrp2 (Gerbe et al., 2008) mettant en évidence qu'ils sont certainement modulés par des facteurs différents.

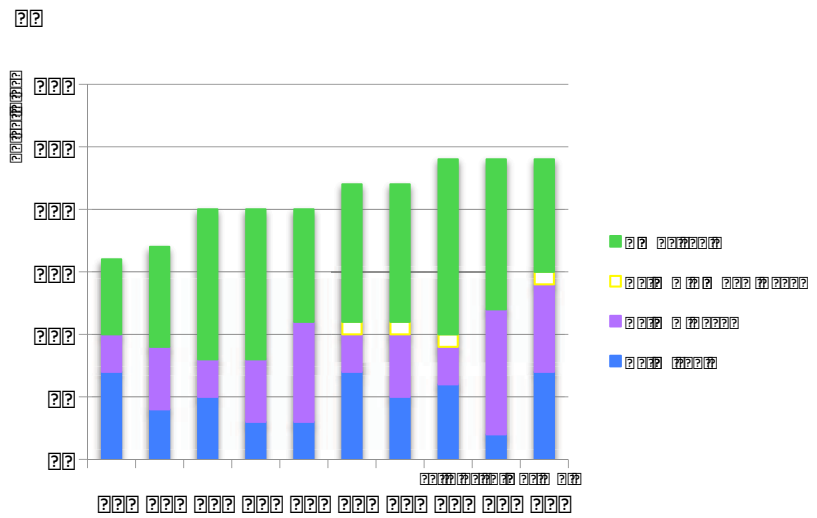
Aucun phénotype préimplantatoire n'a été observé dans les embryons *Dkk1*<sup>-/-</sup>, probablement à cause de redondances fonctionnelles. En effet, Dkk3 et Dkk4 sont exprimés dans les embryons préimplantatoires (Kemp et al., 2005 ; Harwood et al., 2008). Il serait donc intéressant d'inhiber conjointement plusieurs ou tous les membres de la famille Dkk par des expériences de RNAi.

L'étude fonctionnelle de Dkk1 et de la voie Wnt canonique permettra d'élucider leur rôle dans la détermination des cellules pré-EPr et la formation de l'épithélium. Par l'électroporation et la culture d'embryons, Dkk1 ou la  $\beta$ -caténine constitutivement active seront surexprimés. Les co-immunomarquages avec différents marqueurs de l'EPr et l'Epi permettront de déterminer un éventuel rôle de Dkk1 et de la  $\beta$ -caténine. Afin de savoir si la surexpression de Dkk1 peut influencer l'identité cellulaire, il sera nécessaire de réaliser des





	MCI	Dkk	Gata6	Gata6 seul	Gata6 + Dkk1
1	9	0	4	4	0
2	11	0	6	6	0
3	11	0	8	8	0
4	11	1	7	6	1
5	12	0	4	4	0
6	12	2	4	2	2
7	15	2	8	6	2
8	16	0	5	5	0
9	16	0	9	9	0
10	16	5	9	4	5
11	16	1	9	8	1
16	17	4	5	1	4
17	17	6	10	4	6
18	17	2	8	6	2
19	17	3	8	5	3
20	18	0	7	7	0
21	18	4	8	4	4
22	20	5	9	4	5
23	21	2	10	8	2
24	21	3	11	8	3
25	22	3	11	8	3
26	23	3	11	8	3
28	23	5	8	3	5
29	23	5	11	6	5
30	24	2	11	9	2
31	24	3	10	7	3
32	24	10	12	2	10
33	24	5	10	5	5
34	25	8	13	5	8



**Fig.38** : Evolution de l'expression de Dkk1 dans l'embryon comparativement à Gata6 et Nanog. (A) le nombre de cellules exprimant Dkk1 augmente avec le nombre de cellules totales de la MCI. (B) toutes les cellules qui expriment Dkk1 expriment Gata6, mais pas inversement. (C) proportions de cellules exprimant Dkk1, Gata6 et Nanog dans la MCI.

co-marquages avec différents marqueurs de l'EPr tels que Dab2 et Lrp2 et un marqueur des cellules pré-Epi, Nanog. Sachant que l'expression de Dkk1 est induite après celles de Gata6 dans les embryons, il est possible que même si Dkk1 induit la différenciation en EPr, il n'y ait pas induction de Gata6. C'est pourquoi Dab2 et Lrp2 seront examinés puisqu'ils sont plus tardifs et signalent la formation de l'identité épithéliale. Ceci sera également à tester par co-immunomarquages avec Gata6. De plus, les autres facteurs de transcription spécifiques de l'EPr, Gata4 et Sox17 seront aussi examinés pour placer Dkk1 dans la cascade d'induction. L'effet de Dkk1 peut être cellule autonome ou non-autonome. Dans le dernier cas, non seulement les cellules électroporées, mais également les cellules adjacentes se seront différenciées en EPr. Dans le cas d'un mécanisme cellules autonome, Dkk1 agirait uniquement sur les cellules électroporées et pourrait ainsi les empêcher de répondre à un signal Wnt pour se différencier en cellules de l'EPr. Ceci a déjà été observé pour Dkk1 et la voie Wnt canonique, dans le cas de cellules cancéreuses humaines (Bafico et al., 2004). Il est possible, mais peu probable que la surexpression de Dkk1 tue les cellules électroporées. En effet, dans les cellules ES, la surexpression de Dkk1 permet leur différenciation en neurectoderme sans affecter leur survie (Kong et Zhang 2009). De façon intéressante, les auteurs observent l'induction de marqueurs de l'EPr tels que Gata6, Gata4, la laminineB1 ou vHNF1 (Kong, Zhang, 2009). Ceci conforte l'idée d'un rôle de Dkk1 dans la différenciation de l'EPr.

Les lignées rapportrices de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine de type TOP-Gal et BAT-Gal (Das Gupta, Fuchs, 1999 ; Jho et al., 2002 ; Maretto et al., 2003 ; Merrill et al., 2004 ; Currier et al., 2010) n'ont pas permis de détecter une activité qu'à partir de E6.0 (Maretto et al., 2003 ; Merrill et al., 2004). En revanche, récemment une équipe a pu détecter la  $\beta$ -caténine nucléaire dans des embryons de 8 à 16 cellules en culture (Meilhac et al., 2009). La mutation nulle de la  $\beta$ -caténine ne présente pas de phénotype préimplantatoire (Haegel et al., 1995 ; Huelsken et al., 2000 ; Morkel et al., 2003), mais la  $\beta$ -caténine maternelle est présente tardivement (de Vries et al., 2004) et empêche donc l'observation de phénotypes dans les expériences d'inhibition. Sa stabilisation par excision de l'exon 3 et donc de ses sites de phosphorylation n'as pas permis de détecter un signal nucléaire avant l'implantation (Kemler et al., 2004). Il est possible que la  $\beta$ -caténine soit prise en charge par une autre voie de destruction de qui ne nécessiterait pas ces phosphorylations. Une voie passant par p53, APC et le protéasome pourrait ici prendre le relais (Liu et al., 2001 ; Matsuzawa, Reed, 2001). Néanmoins, l'étude du mutant APC<sup>min/min</sup> conduit à une  $\beta$ -caténine cytoplasmique et nucléaire



à E4.75 (Chazaud, Rossant, 2006). De plus, Brachyury, un gène cible de la voie, est exprimé prématurément dans la MCI de ces mutants dès E3.75 (Chazaud, Rossant, 2006). La voie Wnt canonique peut donc être fonctionnelle pendant le développement préimplantatoire pour activer la transcription de gènes cibles. La surexpression de la forme constitutivement active de la  $\beta$ -caténine ( $\Delta 3\beta$ -caténine) est complémentaire à la surexpression de Dkk1 et permettra de comprendre si elle influence le devenir des cellules en pré-Epi. L'activité de la voie sera vérifiée grâce aux marquages par hybridation in situ d'ARNm de gènes cibles tels que Brachyury et l'Axine2. De plus, les mêmes co-marquages que dans le cas de la surexpression de Dkk1 seront à réaliser afin de déterminer l'identité des cellules électroporées.

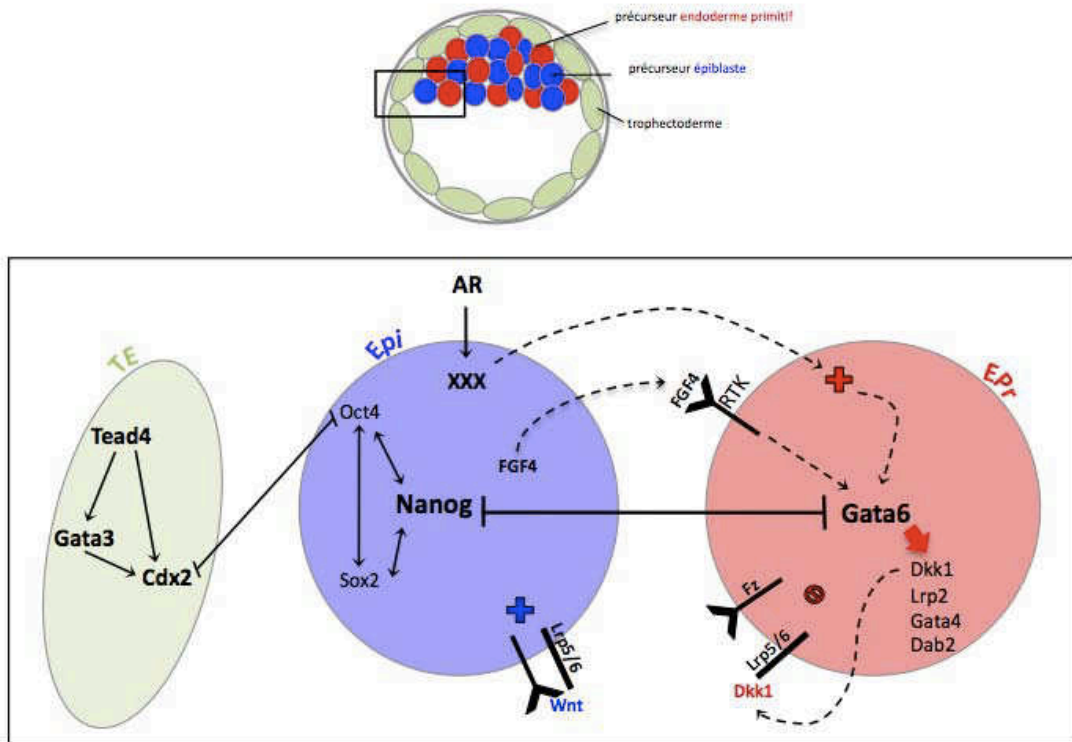
Il serait intéressant de regarder l'expression des récepteurs Lrp5/6 mais également de Kremen1 et 2 interagissant également avec Dkk1 (Bafico et al., 2001 ; Mao et al., 2001 ; Mao et al., 2002). Si l'inhibition de la voie Wnt canonique renforce l'identité endodermale, l'activité de celle-ci doit promouvoir l'identité épiblastique. Cette hypothèse rejoint les résultats sur les cellules ES où elle est associée au maintien de la pluripotence de ces cellules (Sato et al., 2004 ; Hao et al., 2006 ; Ogawa et al., 2006 ; Ying et al., 2008 ; Sato et al., 2009). Différents ligands connus pour activer la cascade canonique sont exprimés au cours du développement préimplantatoire (Wang et al., 2004 ; Kemp et al., 2005 ; Harwood et al., 2008). Les deux ligands prédominants qui pourraient donc être impliqués sont Wnt3a et Wnt10b.

Enfin, il a récemment été montré que Dkk1 peut activer la voie Wnt/PCP. En effet, les défauts de gastrulation observés chez le poisson zèbre suite à un gain de fonction de Dkk1 ne peuvent être corrigés par l'augmentation de l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Caneparo et al., 2007). Les auteurs suggèrent donc l'interaction avec une autre voie et montrent que Dkk1 interagit avec Knypek (Kny) un acteur de la voie Wnt/PCP. Ils proposent un modèle où Dkk1 régule conjointement la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et la voie PCP en inhibant l'une et activant l'autre respectivement par la modulation des propriétés intracellulaires des récepteurs Fz (Caneparo et al., 2007). L'orthologue murin de Kny est le Glypican4 (Gpc4). De façon intéressante, les transcrits de Gpc4 sont localisés au niveau du mésendoderme antérieur à E7.5, une région adjacente à celle de l'expression de Dkk1 (Ybot-Gonzalez et al., 2006 ; Kimura-Yoshida et al., 2005). Dkk1 et Gpc4 pourraient donc avoir un rôle commun à ce stade chez la souris. Il serait intéressant de regarder la localisation de Gpc4 dans les embryons préimplantatoires ainsi que d'autres membres de la voie PCP comme Vangl2. Des effecteurs



de la voie PCP comme Rac1 sont d'ailleurs connus pour être exprimé au cours de la préimplantation (Natale, Watson, 2002).

Dans ce cas de figure, la surexpression de Dkk1 entraînera très probablement d'importants défauts dans la migration des cellules et/ou de la mise en place de l'épithélium. Par exemple, le poivre et sel entre cellules pré-Epi et pré-EPr pourrait persister jusqu'à E4.5. En effet, la voie Wnt/PCP est connue pour ses fonctions dans la régulation des adhésions et mouvements cellulaires (pour revue Simons, Mlodzik, 2008), mécanismes qui ont également été proposés pour être impliqué dans la ségrégation entre précurseurs de l'Epi et de l'EPr et la mise en place de l'épithélium.



**Fig.39** : Modèle de spécification de l'Epi et de l'EPr et du TE, récapitulant un grand nombre des molécules impliquées et les hypothèses du travail présenté.

### III Différenciation de l'EPr et ségrégation avec l'Epi

Les deux axes de recherche que j'ai mené au cours de ma thèse sont inscrits dans la thématique globale de l'équipe s'intéressant à la détermination des premiers lignages cellulaires dans l'embryon préimplantatoire murin et plus particulièrement à la détermination de l'EPr. La voie des rétinoïdes et la signalisation Wnt via son inhibition par Dkk1 sont deux voies potentiellement impliquées dans la différenciation de l'EPr. Il reste difficile pour le moment de les placer dans la chronologie de détermination, différenciation et ségrégation de l'EPr et de l'Epi au cours de la préimplantation (fig.39).

Aux vues des données disponibles, la voie des rétinoïdes pourrait agir au niveau de la ségrégation des populations de cellules pré-Epi et pré-EPr. Les cellules destinées à donner des précurseurs de l'Epi pourraient répondre à l'AR en produisant des molécules sécrétées induisant ainsi la différenciation en précurseurs de l'EPr de cellules avoisinantes (fig.39).

Si Dkk1 joue un rôle dans la différenciation de l'EPr en inhibant la voie Wnt canonique, on peut imaginer que les cellules qui l'expriment sont incapables de répondre à l'activation de cette voie. Cette inhibition empêcherait le maintien de leur pluripotence et les engagerait dans la voie de différenciation de l'EPr (fig.39). Par ce mécanisme, Dkk1 pourrait également agir au niveau du maintien de la détermination des précurseurs.

A ce jour, Gata6 et Nanog sont les marqueurs, de l'EPr et de l'Epi respectivement, les plus précoces. Ils sont co-exprimés dans la morula puis vont progressivement être restreint à la MCI et aux cellules pré-EPr et pré-Epi respectivement. On peut observer deux étapes dans la formation de l'EPr. Dans un premier temps, il y a une détermination de précurseurs de l'EPr et de l'Epi à partir de cellules internes qui expriment conjointement Gata6 et Nanog conduisant au poivre et sel observé dans la MCI de blastocystes à E3.5. Dans un deuxième temps, il y a un tri entre les cellules pré-EPr et pré-Epi conduisant à la ségrégation physique entre les cellules qui formeront l'épithélium endodermique et l'Epi à E4.5.

Très peu de choses sont connues pour la première étape de détermination, mais depuis quelques années, nombreuses expériences suggèrent l'implication de la voie des RTK (Receptor Tyrosine Kinase) dans ces événements (fig.39). En effet, la mutation de gènes comme *Fgf4*, *Fgfr1* et 2 et *Grb2* conduit à l'absence d'EPr in vitro et in vivo (Arman et al., 1998; Chazaud et al., 2006; Esner et al., 2002; Feldman et al., 1995; Goldin and Papaioannou, 2003; Rappolee and Werb, 1990; Wilder et al., 1997). Récemment, les expériences

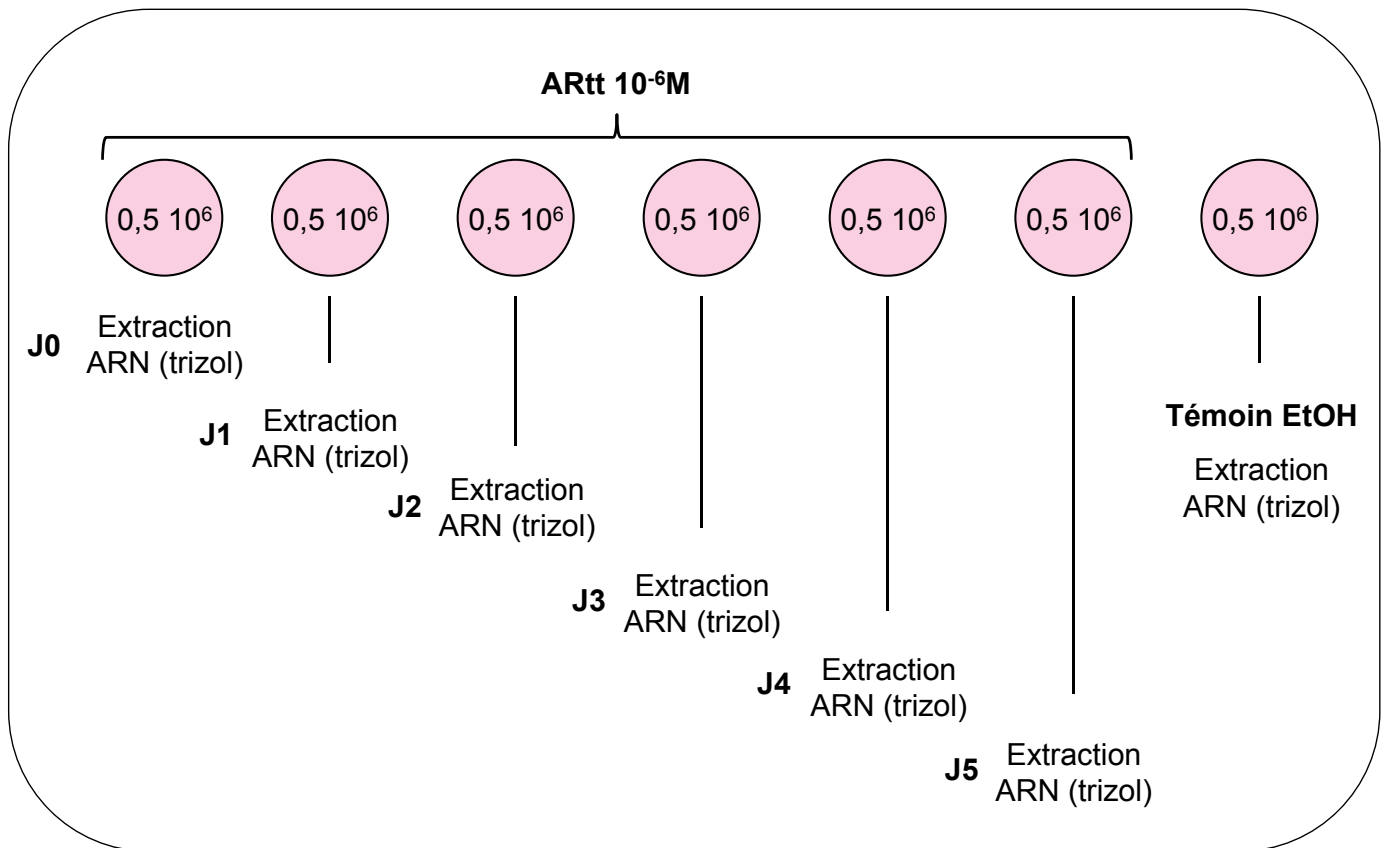




d'inhibition et d'activation de la voie montrent clairement son implication dans la spécification de l'Epi et de l'EPr et dans le maintien de la différence entre les deux lignées (Nichols et al., 2009; Yamanaka et al., 2010). Un modèle de détermination stochastique et progressive est proposé par les auteurs (Yamanaka et al., 2010).



## Matériels et Méthodes



**Fig.40** : Schématisation du protocole de cinétique de différenciation de cellules F9 par 10<sup>-6</sup>M d'Artt. Les cellules sontensemencés à 500.000 cellules par boîte de 10cm de diamètre. La différenciation est réalisée sur 6 jours consécutifs, le témoin indifférencié (J0) inclus. Le milieu est changé tous les jours.

Cible	hôte	dilution	références
CDX2	souris	1/1	BioGenex
DKK1	chèvre	1/10	R&D Systems
GATA6	chèvre	1/350	R&D Systems
NANOG	lapin	1/350	Abcam
OCT4	souris	1/500	Abcam

**Fig.41** : Anticorps primaires utilisés dans l'étude

## **MATERIELS ET METHODES**

### **Extraction d'ARN, Reverse transcription et quantification**

La lignée de cellules de carcinome embryonnaire de souris F9 sont cultivées dans un milieu complet comme décrit dans la partie matériels et méthodes du manuscrit « Components of the retinoic acid signaling cascade are differentially expressed in the mouse preimplantation embryo. ». Un schéma de la cinétique de différenciation est présenté dans la figure 40.

Toutes les expériences de reverse transcription, PCR et qPCR ainsi que l'hybridation in situ sont également décrits dans le manuscrit. Les primers testés pour Dkk1 sont : 5'ctgaagatgaggagtgcggctc3' et 5' ggctgtggtcagagggcatg 3'.

### **Cultures d'embryons**

Après récupération d'embryons à E2.5 dans du M2 (Sigma), ils sont mis en culture à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Soit ils sont cultivés en M16 (Sigma) pendant 24h puis transférés dans du RPMI supplémenté de 15% FBS et 10% pénicilline/streptavidine (GIBCO) et cultivés 24h supplémentaires. Soit ils sont mis en culture dans du milieu G-2™ (Vitrolife) de 24 à 48 heures.

### **Immunomarquages**

Après prélèvement, les embryons sont fixés dans la PFA4% sur la nuit. Ils sont lavés deux fois dans du PBS-Triton 0,1% et perméabilisés dans du PBS-Triton 0,5%. Le blocage des sites aspécifiques se fait dans du PBS-Triton 0,1% avec 10% de sérum puis les embryons sont incubés avec l'anticorps primaire (fig.41) sur la nuit à 4°C. Après 5 lavages successifs avec du PBS-Triton 0,1% les embryons sont incubés avec les anticorps secondaires adéquats et le DAPI pendant 1 à 2 heures. Les embryons marqués sont imagés au microscope confocal Leica XXXX.



Le double marquage Dkk1/Gata6 nécessite une étape de fixation par la PFA4% entre les deux anticorps primaires faits chez le même hôte.

Afin de pouvoir réaliser l'immunomarquage à cinq couleurs, nous utilisons pour la révélation de Cdx2 un anticorps secondaire couplé à la biotine et révélé par une streptavidine couplée à un fluorochrome 494-Chromeo (Streptavidine 494 Chromeo, Active Motif).





## Références Bibliographiques

- Abu-Abed, S., P. Dolle, D. Metzger, B. Beckett, P. Chambon, and M. Petkovich. 2001. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev.* 15:226-40.
- Alarcon, V.B., and Y. Marikawa. 2005. Unbiased contribution of the first two blastomeres to mouse blastocyst development. *Mol Reprod Dev.* 72:354-61.
- Andrews, P.W. 2002. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357:405-17.
- Ang, H.L., L. Deltour, T.F. Hayamizu, M. Zgombic-Knight, and G. Duester. 1996. Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J Biol Chem.* 271:9526-34.
- Ang, H.L., and G. Duester. 1997. Initiation of retinoid signaling in primitive streak mouse embryos: spatiotemporal expression patterns of receptors and metabolic enzymes for ligand synthesis. *Dev Dyn.* 208:536-43.
- Ang, S.L., and D.B. Constam. 2004. A gene network establishing polarity in the early mouse embryo. *Semin Cell Dev Biol.* 15:555-61.
- Arceci, R.J., A.A. King, M.C. Simon, S.H. Orkin, and D.B. Wilson. 1993. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol.* 13:2235-46.
- Arman, E., R. Haffner-Krausz, Y. Chen, J.K. Heath, and P. Lonai. 1998. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:5082-7.
- Artzt, K., P. Dubois, D. Bennett, H. Condamine, C. Babinet, and F. Jacob. 1973. Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70:2988-92.
- Avilion, A.A., S.K. Nicolis, L.H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, and R. Lovell-Badge. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17:126-40.



- Bafico, A., G. Liu, A. Yaniv, A. Gazit, and S.A. Aaronson. 2001. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol.* 3:683-6.
- Bafico, A., G. Liu, L. Goldin, V. Harris, S. A. Aaronson. 2004. An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells. *Cancer Cell.* 6:497-506.
- Bastien, J., and C. Rochette-Egly. 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 328:1-16.
- Beddington, R.S., and E.J. Robertson. 1989. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development.* 105:733-7.
- Ben-Shushan, E., H. Sharir, E. Pikarsky, and Y. Bergman. 1995. A dynamic balance between ARP-1/COUP-TFII, EAR-3/COUP-TFI, and retinoic acid receptor:retinoid X receptor heterodimers regulates Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 15:1034-48.
- Bernstein, E., E.M. Duncan, O. Masui, J. Gil, E. Heard, and C.D. Allis. 2006. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol.* 26:2560-9.
- Bielinska, M., N. Narita, and D.B. Wilson. 1999. Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development. *Int J Dev Biol.* 43:183-205.
- Bielinska, M., and D.B. Wilson. 1997. Induction of yolk sac endoderm in GATA-4-deficient embryoid bodies by retinoic acid. *Mech Dev.* 65:43-54.
- Bischoff, M., D.E. Parfitt, and M. Zernicka-Goetz. 2008. Formation of the embryonic-abembryonic axis of the mouse blastocyst: relationships between orientation of early cleavage divisions and pattern of symmetric/asymmetric divisions. *Development.* 135:953-62.
- Bouniol, C., E. Nguyen, and P. Debey. 1995. Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo. *Exp Cell Res.* 218:57-62.
- Boyer, L.A., T.I. Lee, M.F. Cole, S.E. Johnstone, S.S. Levine, J.P. Zucker, M.G. Guenther, R.M. Kumar, H.L. Murray, R.G. Jenner, D.K. Gifford, D.A. Melton, R. Jaenisch, and R.A. Young. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 122:947-56.
- Brennan, K., J.M. Gonzalez-Sancho, L.A. Castelo-Soccio, L.R. Howe, and A.M. Brown. 2004. Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize beta-catenin independently of Frizzled proteins. *Oncogene.* 23:4873-84.



- Brons, I.G., L.E. Smithers, M.W. Trotter, P. Rugg-Gunn, B. Sun, S.M. Chuva de Sousa Lopes, S.K. Howlett, A. Clarkson, L. Ahrlund-Richter, R.A. Pedersen, and L. Vallier. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 448:191-5.
- Brook, F.A., and R.L. Gardner. 1997. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:5709-12.
- Cai, K., and L.J. Gudas. 2009. Retinoic acid receptors and GATA transcription factors activate the transcription of the human lecithin:retinol acyltransferase gene. *Int J Biochem Cell Biol*. 41:546-53.
- Campo-Paysaa F., F. Marlétaz, V. Laudet, M. Schubert. 2008. Retinoic Acid Signaling in Development: Tissue-Specific Functions and Evolutionary Origins. *genesis*. 46:640–656
- Caneparo, L., Y.L. Huang, N. Staudt, M. Tada, R. Ahrendt, O. Kazanskaya, C. Niehrs, and C. Houart. 2007. Dickkopf-1 regulates gastrulation movements by coordinated modulation of Wnt/beta catenin and Wnt/PCP activities, through interaction with the Dally-like homolog Knypek. *Genes Dev*. 21:465-80.
- Capo-Chichi, C.D., M.E. Rula, J.L. Smedberg, L. Vanderveer, M.S. Parmacek, E.E. Morrissey, A.K. Godwin, and X.X. Xu. 2005. Perception of differentiation cues by GATA factors in primitive endoderm lineage determination of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*. 286:574-86.
- Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, and A. Smith. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 113:643-55.
- Chambers, I., and A. Smith. 2004. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*. 23:7150-60.
- Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*. 10:940-54.
- Chapman, V., L. Forrester, J. Sanford, N. Hastie, and J. Rossant. 1984. Cell lineage-specific undermethylation of mouse repetitive DNA. *Nature*. 307:284-6.
- Chazaud, C., and J. Rossant. 2006. Disruption of early proximodistal patterning and AVE formation in Apc mutants. *Development*. 133:3379-87.
- Chazaud, C., Y. Yamanaka, T. Pawson, and J. Rossant. 2006. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell*. 10:615-24.



- Chen, L., A. Yabuuchi, S. Eminli, A. Takeuchi, C.W. Lu, K. Hochedlinger, and G.Q. Daley. 2009. Cross-regulation of the Nanog and Cdx2 promoters. *Cell Res.* 19:1052-61.
- Cheng, A.M., T.M. Saxton, R. Sakai, S. Kulkarni, G. Mbamalu, W. Vogel, C.G. Tortorice, R.D. Cardiff, J.C. Cross, W.J. Muller, and T. Pawson. 1998. Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell.* 95:793-803.
- Chew, J.L., Y.H. Loh, W. Zhang, X. Chen, W.L. Tam, L.S. Yeap, P. Li, Y.S. Ang, B. Lim, P. Robson, and H.H. Ng. 2005. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 25:6031-46.
- Chiba, H., J. Clifford, D. Metzger, and P. Chambon. 1997a. Distinct retinoid X receptor-retinoic acid receptor heterodimers are differentially involved in the control of expression of retinoid target genes in F9 embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 17:3013-20.
- Chiba, H., J. Clifford, D. Metzger, and P. Chambon. 1997b. Specific and redundant functions of retinoid X Receptor/Retinoic acid receptor heterodimers in differentiation, proliferation, and apoptosis of F9 embryonal carcinoma cells. *J Cell Biol.* 139:735-47.
- Chroscicka, A., S. Komorowski, and M. Maleszewski. 2004. Both blastomeres of the mouse 2-cell embryo contribute to the embryonic portion of the blastocyst. *Mol Reprod Dev.* 68:308-12.
- Coffinier, C., D. Thepot, C. Babinet, M. Yaniv, and J. Barra. 1999. Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development.* 126:4785-94.
- Cohlan, S.Q. 1953. Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science.* 117:535-6.
- Cooney, A.J., S.Y. Tsai, B.W. O'Malley, and M.J. Tsai. 1992. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTCa response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Mol Cell Biol.* 12:4153-63.
- Corry, G.N., B. Tanasijevic, E.R. Barry, W. Krueger, and T.P. Rasmussen. 2009. Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 87:297-313.
- Currier, N., K. Chea, M. Hlavacova, D.J. Sussman, D.C. Seldin, and I. Dominguez. 2010. Dynamic expression of a LEF-EGFP Wnt reporter in mouse development and cancer. *Genesis.* 48:183-94.





- DasGupta, R., and E. Fuchs. 1999. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development*. 126:4557-68.
- de The, H., A. Marchio, P. Tiollais, and A. Dejean. 1989. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes. *EMBO J.* 8:429-33.
- de The, H., M.M. Vivanco-Ruiz, P. Tiollais, H. Stunnenberg, and A. Dejean. 1990. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature*. 343:177-80.
- de Vries, W.N., L.T. Binns, K.S. Fancher, J. Dean, R. Moore, R. Kemler, and B.B. Knowles. 2000. Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: a means to study maternal effect genes. *Genesis*. 26:110-2.
- De Vries, W.N., A.V. Evsikov, B.E. Haac, K.S. Fancher, A.E. Holbrook, R. Kemler, D. Solter, and B.B. Knowles. 2004. Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. *Development*. 131:4435-45.
- Deltour, L., M.H. Foglio, and G. Duester. 1999. Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase Adh1, Adh3, and Adh4 null mutant mice. Overlapping roles of Adh1 and Adh4 in ethanol clearance and metabolism of retinol to retinoic acid. *J Biol Chem*. 274:16796-801.
- Desbaillets, I., U. Ziegler, P. Groscurth, and M. Gassmann. 2000. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol*. 85:645-51.
- Dietrich, J.E., and T. Hiragi. 2007. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development*. 134:4219-31.
- Dilworth, F.J., and P. Chambon. 2001. Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene*. 20:3047-54.
- Ding, J., L. Yang, Y.T. Yan, A. Chen, N. Desai, A. Wynshaw-Boris, and M.M. Shen. 1998. Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo. *Nature*. 395:702-7.
- Dolle, P. 2009. Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal*. 7:e006.
- Duester, G. 2008. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell*. 134:921-31.



- Duester, G., F.A. Mic, and A. Molotkov. 2003. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact.* 143-144:201-10.
- Duester, G. 2001. Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. *Chem Biol Interact.* 130–132:469–480
- Dupe, V., M. Davenne, J. Brocard, P. Dolle, M. Mark, A. Dierich, P. Chambon, and F.M. Rijli. 1997. In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development.* 124:399-410.
- Dupe, V., N.B. Ghyselinck, O. Wendling, P. Chambon, and M. Mark. 1999. Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development.* 126:5051-9.
- Dupe, V., N. Matt, J.M. Garnier, P. Chambon, M. Mark, and N.B. Ghyselinck. 2003. A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:14036-41.
- Ellwanger, K., H. Saito, P. Clement-Lacroix, N. Maltry, J. Niedermeyer, W.K. Lee, R. Baron, G. Rawadi, H. Westphal, and C. Niehrs. 2008. Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Mol Cell Biol.* 28:4875-82.
- Esner, M., J. Pachernik, A. Hampl, and P. Dvorak. 2002. Targeted disruption of fibroblast growth factor receptor-1 blocks maturation of visceral endoderm and cavitation in mouse embryoid bodies. *Int J Dev Biol.* 46:817-25.
- Evans, M.J. 1972. The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *J Embryol Exp Morphol.* 28:163-76.
- Evans, M.J., and M.H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292:154-6.
- Fan, X., A. Molotkov, S. Manabe, C.M. Donmoyer, L. Deltour, M.H. Foglio, A.E. Cuenca, W.S. Blaner, S.A. Lipton, and G. Duester. 2003. Targeted disruption of Aldh1a1 (Raldh1) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Mol Cell Biol.* 23:4637-48.
- Fassler, R., and M. Meyer. 1995. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev.* 9:1896-908.
- Fassler, R., M. Pfaff, J. Murphy, A.A. Noegel, S. Johansson, R. Timpl, and R. Albrecht. 1995. Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion,



- and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. *J Cell Biol.* 128:979-88.
- Feldman, B., W. Poueymirou, V.E. Papaioannou, T.M. DeChiara, and M. Goldfarb. 1995. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science.* 267:246-9.
- Fleming, T.P. 1987. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev Biol.* 119:520-31.
- Fujii, H., T. Sato, S. Kaneko, O. Gotoh, Y. Fujii-Kuriyama, K. Osawa, S. Kato, and H. Hamada. 1997. Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J.* 16:4163-73.
- Fujikura, J., E. Yamato, S. Yonemura, K. Hosoda, S. Masui, K. Nakao, J. Miyazaki Ji, and H. Niwa. 2002. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev.* 16:784-9.
- Futaki, S., Y. Hayashi, T. Emoto, C.N. Weber, and K. Sekiguchi. 2004. Sox7 plays crucial roles in parietal endoderm differentiation in F9 embryonal carcinoma cells through regulating Gata-4 and Gata-6 expression. *Mol Cell Biol.* 24:10492-503.
- Gao, F., H.Y. Shi, C. Daughy, N. Cella, and M. Zhang. 2004. Maspin plays an essential role in early embryonic development. *Development.* 131:1479-89.
- Gardner, R.L. 1997. The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse. *Development.* 124:289-301.
- Gardner, R.L. 2001. Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development. *Development.* 128:839-47.
- Gerbe, F., B. Cox, J. Rossant, and C. Chazaud. 2008. Dynamic expression of Lrp2 pathway members reveals progressive epithelial differentiation of primitive endoderm in mouse blastocyst. *Dev Biol.* 313:594-602.
- Glinka, A., W. Wu, H. Delius, A.P. Monaghan, C. Blumenstock, and C. Niehrs. 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature.* 391:357-62.
- Goldin, S.N., and V.E. Papaioannou. 2003. Paracrine action of FGF4 during periimplantation development maintains trophectoderm and primitive endoderm. *Genesis.* 36:40-7.
- Gordon, M.D., and R. Nusse. 2006. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 281:22429-33.



- Grigoryan, T., P. Wend, A. Klaus, and W. Birchmeier. 2008. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev.* 22:2308-41.
- Gueth-Hallonet, C., A. Santa-Maria, P. Verroust, and B. Maro. 1994. Gp330 is specifically expressed in outer cells during epithelial differentiation in the preimplantation mouse embryo. *Development.* 120:3289-99.
- Haegel, H., L. Larue, M. Ohsugi, L. Fedorov, K. Herrenknecht, and R. Kemler. 1995. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development.* 121:3529-37.
- Hamazaki, T., S.M. Kehoe, T. Nakano, and N. Terada. 2006. The Grb2/Mek pathway represses Nanog in murine embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 26:7539-49.
- Hao, J., T.G. Li, X. Qi, D.F. Zhao, and G.Q. Zhao. 2006. WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol.* 290:81-91.
- Harwood, B.N., S.K. Cross, E.E. Radford, B.E. Haac, and W.N. De Vries. 2008. Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos. *Dev Dyn.* 237:1099-111.
- He, X., M. Semenov, K. Tamai, and X. Zeng. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development.* 131:1663-77.
- Henckel, A., S. Toth, and P. Arnaud. 2007. Early mouse embryo development: could epigenetics influence cell fate determination? *Bioessays.* 29:520-4.
- Hiiragi, T., and D. Solter. 2004. First cleavage plane of the mouse egg is not predetermined but defined by the topology of the two apposing pronuclei. *Nature.* 430:360-4.
- Hirasawa, R., and H. Sasaki. 2009. Dynamic transition of Dnmt3b expression in mouse pre- and early post-implantation embryos. *Gene Expr Patterns.* 9:27-30.
- Home, P., S. Ray, D. Dutta, I. Bronshteyn, M. Larson, and S. Paul. 2009. GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. *J Biol Chem.* 284:28729-37.
- Hosler, B.A., G.J. LaRosa, J.F. Grippo, and L.J. Gudas. 1989. Expression of REX-1, a gene containing zinc finger motifs, is rapidly reduced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 9:5623-9.
- Huang, F.J., Y.D. Hsuw, K.C. Lan, H.Y. Kang, S.Y. Chang, Y.C. Hsu, and K.E. Huang. 2006. Adverse effects of retinoic acid on embryo development and the selective expression of retinoic acid receptors in mouse blastocysts. *Hum Reprod.* 21:202-9.





- Huelsken, J., R. Vogel, V. Brinkmann, B. Erdmann, C. Birchmeier, and W. Birchmeier. 2000. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol.* 148:567-78.
- Ikeya, M., S.M. Lee, J.E. Johnson, A.P. McMahon, and S. Takada. 1997. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature.* 389:966-70.
- Inoue, A., O. Sato, K. Homma, and M. Ikebe. 2002. DOC-2/DAB2 is the binding partner of myosin VI. *Biochem Biophys Res Commun.* 292:300-7.
- Jedrusik, A., D.E. Parfitt, G. Guo, M. Skamagki, J.B. Grabarek, M.H. Johnson, P. Robson, and M. Zernicka-Goetz. 2008. Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes Dev.* 22:2692-706.
- Jho, E.H., T. Zhang, C. Domon, C.K. Joo, J.N. Freund, and F. Costantini. 2002. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 22:1172-83.
- Johnson, M.H., and J.M. McConnell. 2004. Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 15:583-97.
- Johnson, M.H., and C.A. Ziomek. 1983. Cell interactions influence the fate of mouse blastomeres undergoing the transition from the 16- to the 32-cell stage. *Dev Biol.* 95:211-8.
- Kastner, P., M. Mark, and P. Chambon. 1995. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell.* 83:859-69.
- Kastner, P., M. Mark, N. Ghyselinck, W. Krezel, V. Dupe, J.M. Grondona, and P. Chambon. 1997. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development.* 124:313-26.
- Kato, M., M.S. Patel, R. Levasseur, I. Lobov, B.H. Chang, D.A. Glass, 2nd, C. Hartmann, L. Li, T.H. Hwang, C.F. Brayton, R.A. Lang, G. Karsenty, and L. Chan. 2002. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol.* 157:303-14.
- Kawaguchi, R., J. Yu, J. Honda, J. Hu, J. Whitelegge, P. Ping, P. Wiita, D. Bok, and H. Sun. 2007. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science.* 315:820-5.
- Kawano, Y., and R. Kypta. 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 116:2627-34.



- Kelly, O.G., K.I. Pinson, and W.C. Skarnes. 2004. The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development*. 131:2803-15.
- Kemler, R., A. Hierholzer, B. Kanzler, S. Kuppig, K. Hansen, M.M. Taketo, W.N. de Vries, B.B. Knowles, and D. Solter. 2004. Stabilization of beta-catenin in the mouse zygote leads to premature epithelial-mesenchymal transition in the epiblast. *Development*. 131:5817-24.
- Kemp, C., E. Willems, S. Abdo, L. Lambiv, and L. Leyns. 2005. Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Dev Dyn*. 233:1064-75.
- Kemp, C.R., E. Willems, D. Wawrzak, M. Hendrickx, T. Agbor Agbor, and L. Leyns. 2007. Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical Wnt signaling. *Dev Dyn*. 236:2011-9.
- Kielman, M.F., M. Rindapaa, C. Gaspar, N. van Poppel, C. Breukel, S. van Leeuwen, M.M. Taketo, S. Roberts, R. Smits, and R. Fodde. 2002. Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat Genet*. 32:594-605.
- Kikuchi, A., H. Yamamoto, and S. Kishida. 2007. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal*. 19:659-71.
- Kikuchi, A., H. Yamamoto, and A. Sato. 2009. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol*. 19:119-29.
- Kimura, C., M.M. Shen, N. Takeda, S. Aizawa, and I. Matsuo. 2001. Complementary functions of Otx2 and Cripto in initial patterning of mouse epiblast. *Dev Biol*. 235:12-32.
- Kimura, C., K. Yoshinaga, E. Tian, M. Suzuki, S. Aizawa, and I. Matsuo. 2000. Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. *Dev Biol*. 225:304-21.
- Kimura-Yoshida, C., H. Nakano, D. Okamura, K. Nakao, S. Yonemura, J.A. Belo, S. Aizawa, Y. Matsui, and I. Matsuo. 2005. Canonical Wnt signaling and its antagonist regulate anterior-posterior axis polarization by guiding cell migration in mouse visceral endoderm. *Dev Cell*. 9:639-50.
- Kleinsmith, L.J., and G.B. Pierce, Jr. 1964. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res*. 24:1544-51.



- Kliwer, S.A., K. Umesono, R.A. Heyman, D.J. Mangelsdorf, J.A. Dyck, and R.M. Evans. 1992. Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:1448-52.
- Kong X.B., C. Zhang. 2009. Dickkopf (Dkk) 1 promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells toward neuroectoderm. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal*. 45:185–193
- Korinek, V., N. Barker, K. Willert, M. Molenaar, J. Roose, G. Wagenaar, M. Markman, W. Lamers, O. Destree, and H. Clevers. 1998. Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol*. 18:1248-56.
- Koutsourakis, M., A. Langeveld, R. Patient, R. Beddington, and F. Grosveld. 1999. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development*. 126:723-32.
- Krezel, W., V. Dupe, M. Mark, A. Dierich, P. Kastner, and P. Chambon. 1996. RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta +/-RXR gamma -/- mutant mice are viable. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:9010-4.
- Kruse, S.W., K. Suino-Powell, X.E. Zhou, J.E. Kretschman, R. Reynolds, C. Vornrhein, Y. Xu, L. Wang, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, and H.E. Xu. 2008. Identification of COUP-TFII orphan nuclear receptor as a retinoic acid-activated receptor. *PLoS Biol*. 6:e227.
- Kubota, H., H. Chiba, Y. Takakuwa, M. Osanai, H. Tobioka, G. Kohama, M. Mori, and N. Sawada. 2001. Retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor gamma mediate expression of genes encoding tight-junction proteins and barrier function in F9 cells during visceral endodermal differentiation. *Exp Cell Res*. 263:163-72.
- Kunath, T., D. Arnaud, G.D. Uy, I. Okamoto, C. Chureau, Y. Yamanaka, E. Heard, R.L. Gardner, P. Avner, and J. Rossant. 2005. Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development*. 132:1649-61.
- Kuo, C.T., E.E. Morrissey, R. Anandappa, K. Sigrist, M.M. Lu, M.S. Parmacek, C. Soudais, and J.M. Leiden. 1997. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*. 11:1048-60.
- Kurimoto, K., Y. Yabuta, Y. Ohinata, Y. Ono, K.D. Uno, R.G. Yamada, H.R. Ueda, and M. Saitou. 2006. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res*. 34:e42.



- Kuroda, T., M. Tada, H. Kubota, H. Kimura, S.Y. Hatano, H. Suemori, N. Nakatsuji, and T. Tada. 2005. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol.* 25:2475-85.
- Lallemand, Y., V. Luria, R. Haffner-Krausz, and P. Lonai. 1998. Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. *Transgenic Res.* 7:105-12.
- Lane, N., W. Dean, S. Erhardt, P. Hajkova, A. Surani, J. Walter, and W. Reik. 2003. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis.* 35:88-93.
- Langton, S., and L.J. Gudas. 2008. CYP26A1 knockout embryonic stem cells exhibit reduced differentiation and growth arrest in response to retinoic acid. *Dev Biol.* 315:331-54.
- Lavial, F., H. Acloque, F. Bertocchini, D.J. Macleod, S. Boast, E. Bachelard, G. Montillet, S. Thenot, H.M. Sang, C.D. Stern, J. Samarut, and B. Pain. 2007. The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells. *Development.* 134:3549-63.
- Lewis, S.L., P.L. Khoo, R. Andrea De Young, H. Bildsoe, M. Wakamiya, R.R. Behringer, M. Mukhopadhyay, H. Westphal, and P.P. Tam. 2007. Genetic interaction of Gsc and Dkk1 in head morphogenesis of the mouse. *Mech Dev.* 124:157-165.
- Li, J., W.M. Liu, Y.J. Cao, S. Peng, Y. Zhang, and E.K. Duan. 2008. Roles of Dickkopf-1 and its receptor Kremen1 during embryonic implantation in mice. *Fertil Steril.* 90:1470-9.
- Lin, B., G.Q. Chen, D. Xiao, S.K. Kolluri, X. Cao, H. Su, and X.K. Zhang. 2000. Orphan receptor COUP-TF is required for induction of retinoic acid receptor beta, growth inhibition, and apoptosis by retinoic acid in cancer cells. *Mol Cell Biol.* 20:957-70.
- Liu, J., J. Stevens, C.A. Rote, H.J. Yost, Y. Hu, K.L. Neufeld, R.L. White, N. Matsunami. 2001. Siah-1 Mediates a Novel  $\beta$ -Catenin Degradation Pathway Linking p53 to the Adenomatous Polyposis Coli Protein. *Mol. Cell.* 7:927-936.
- Loh, Y.H., Q. Wu, J.L. Chew, V.B. Vega, W. Zhang, X. Chen, G. Bourque, J. George, B. Leong, J. Liu, K.Y. Wong, K.W. Sung, C.W. Lee, X.D. Zhao, K.P. Chiu, L. Lipovich, V.A. Kuznetsov, P. Robson, L.W. Stanton, C.L. Wei, Y. Ruan, B. Lim, and H.H. Ng. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* 38:431-40.
- Loudig, O., G.A. Maclean, N.L. Dore, L. Luu, and M. Petkovich. 2005. Transcriptional cooperativity between distant retinoic acid response elements in regulation of Cyp26A1 inducibility. *Biochem J.* 392:241-8.





- Louvet-Vallee, S., S. Vinot, and B. Maro. 2005. Mitotic spindles and cleavage planes are oriented randomly in the two-cell mouse embryo. *Curr Biol.* 15:464-9.
- MacLean, G., S. Abu-Abed, P. Dolle, A. Tahayato, P. Chambon, and M. Petkovich. 2001. Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech Dev.* 107:195-201.
- Mak, W., T.B. Nesterova, M. de Napoles, R. Appanah, S. Yamanaka, A.P. Otte, and N. Brockdorff. 2004. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science.* 303:666-9.
- Malbon, C.C., and H.Y. Wang. 2006. Dishevelled: a mobile scaffold catalyzing development. *Curr Top Dev Biol.* 72:153-66.
- Mangelsdorf, D.J., U. Borgmeyer, R.A. Heyman, J.Y. Zhou, E.S. Ong, A.E. Oro, A. Kakizuka, and R.M. Evans. 1992. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* 6:329-44.
- Mangelsdorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R.M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 83:835-9.
- Mao, B., W. Wu, G. Davidson, J. Marhold, M. Li, B.M. Mechler, H. Delius, D. Hoppe, P. Stannek, C. Walter, A. Glinka, and C. Niehrs. 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature.* 417:664-7.
- Mao, B., W. Wu, Y. Li, D. Hoppe, P. Stannek, A. Glinka, and C. Niehrs. 2001. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature.* 411:321-5.
- Maretto, S., M. Cordenonsi, S. Dupont, P. Braghetta, V. Broccoli, A.B. Hassan, D. Volpin, G.M. Bressan, and S. Piccolo. 2003. Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3299-304.
- Mark, M., N.B. Ghyselinck, and P. Chambon. 2006. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:451-80.
- Mark, M., N.B. Ghyselinck, and P. Chambon. 2009. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal.* 7:e002.
- Marshall, H., A. Morrison, M. Studer, H. Popperl, and R. Krumlauf. 1996. Retinoids and Hox genes. *FASEB J.* 10:969-78.



- Martin, C.A., L.M. Ziegler, and J.L. Napoli. 1990. Retinoic acid, dibutyryl-cAMP, and differentiation affect the expression of retinoic acid receptors in F9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:4804-8.
- Martin, G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78:7634-8.
- Masui, S., S. Ohtsuka, R. Yagi, K. Takahashi, M.S. Ko, and H. Niwa. 2008. Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells. *BMC Dev Biol*. 8:45.
- Matsuzawa S., J.C. Reed. 2001. Siah-1, SIP, and Ebi Collaborate in a Novel Pathway for - Catenin Degradation Linked to p53 Responses. *Mol. Cell*. 7:915–926.
- Matt, N., C.K. Schmidt, V. Dupe, C. Dennefeld, H. Nau, P. Chambon, M. Mark, and N.B. Ghyselinck. 2005. Contribution of cellular retinol-binding protein type 1 to retinol metabolism during mouse development. *Dev Dyn*. 233:167-76.
- McNeill, H. 2009. Planar cell polarity and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 20:2104-11.
- Meilhac, S.M., R.J. Adams, S.A. Morris, A. Danckaert, J.F. Le Garrec, and M. Zernicka-Goetz. 2009. Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Dev Biol*. 331:210-21.
- Merrill, B.J., H.A. Pasolli, L. Polak, M. Rendl, M.J. Garcia-Garcia, K.V. Anderson, and E. Fuchs. 2004. Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development*. 131:263-74.
- Mesnard, D., M. Guzman-Ayala, and D.B. Constam. 2006. Nodal specifies embryonic visceral endoderm and sustains pluripotent cells in the epiblast before overt axial patterning. *Development*. 133:2497-505.
- Meszaros, R., M. Akerlund, T. Hjalt, M. Durbeej, and P. Ekblom. 2007. Gene expression profiling of differentiating embryonic stem cells expressing dominant negative fibroblast growth factor receptor 2. *Matrix Biol*. 26:197-205.
- Mic, F.A., R.J. Haselbeck, A.E. Cuenca, and G. Duester. 2002. Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of Raldh2 null mutant mice. *Development*. 129:2271-82.
- Mic, F.A., A. Molotkov, X. Fan, A.E. Cuenca, and G. Duester. 2000. RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development. *Mech Dev*. 97:227-30.
- Mikels, A.J., and R. Nusse. 2006. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*. 4:e115.



- Miller, J.R. 2002. The Wnts. *Genome Biol.* 3:REVIEWS3001.
- Mishra, S.K., N.R. Agostinelli, T.J. Brett, I. Mizukami, T.S. Ross, and L.M. Traub. 2001. Clathrin- and AP-2-binding sites in HIP1 uncover a general assembly role for endocytic accessory proteins. *J Biol Chem.* 276:46230-6.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, and S. Yamanaka. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 113:631-42.
- Miura, S., A.P. Singh, and Y. Mishina. 2010. Bmpr1a is required for proper migration of the AVE through regulation of Dkk1 expression in the pre-streak mouse embryo. *Dev Biol.* 341:246-54.
- Mohan M., J.R. Malayer, R.D. Geisert, G.L. Morgan. 2001. Expression of retinol-binding protein messenger RNA and retinoic acid receptors in preattachment bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 60:289–296.
- Mohan M., J.R. Malayer, R.D. Geisert, G.L. Morgan. 2002. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. *Biol. Reprod.* 66:692–700.
- Molotkov, A., L. Deltour, M.H. Foglio, A.E. Cuenca, and G. Duester. 2002a. Distinct retinoid metabolic functions for alcohol dehydrogenase genes Adh1 and Adh4 in protection against vitamin A toxicity or deficiency revealed in double null mutant mice. *J Biol Chem.* 277:13804-11.
- Molotkov, A., X. Fan, and G. Duester. 2002b. Excessive vitamin A toxicity in mice genetically deficient in either alcohol dehydrogenase Adh1 or Adh3. *Eur J Biochem.* 269:2607-12.
- Molotkov, A., N. Molotkova, and G. Duester. 2005. Retinoic acid generated by Raldh2 in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development. *Dev Dyn.* 232:950-7.
- Molotkov, A., N. Molotkova, and G. Duester. 2006. Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning. *Development.* 133:1901-10.
- Molotkova, N., A. Molotkov, I.O. Sirbu, and G. Duester. 2005. Requirement of mesodermal retinoic acid generated by Raldh2 for posterior neural transformation. *Mech Dev.* 122:145-55.



- Moore, R., K.Q. Cai, D.O. Escudero, and X.X. Xu. 2009. Cell adhesive affinity does not dictate primitive endoderm segregation and positioning during murine embryoid body formation. *Genesis*. 47:579-89.
- Moore, T. 1965. Vitamin A deficiency and excess. *Proc Nutr Soc*. 24:129-35.
- Morkel, M., J. Huelsken, M. Wakamiya, J. Ding, M. van de Wetering, H. Clevers, M.M. Taketo, R.R. Behringer, M.M. Shen, and W. Birchmeier. 2003. Beta-catenin regulates Cripto- and Wnt3-dependent gene expression programs in mouse axis and mesoderm formation. *Development*. 130:6283-94.
- Morris, S.A., R.T. Teo, H. Li, P. Robson, D.M. Glover, and M. Zernicka-Goetz. 2010. Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:6364-9.
- Morris, S.M., S.D. Arden, R.C. Roberts, J. Kendrick-Jones, J.A. Cooper, J.P. Luzio, and F. Buss. 2002a. Myosin VI binds to and localises with Dab2, potentially linking receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton. *Traffic*. 3:331-41.
- Morris, S.M., M.D. Tallquist, C.O. Rock, and J.A. Cooper. 2002b. Dual roles for the Dab2 adaptor protein in embryonic development and kidney transport. *EMBO J*. 21:1555-64.
- Morrisey, E.E., Z. Tang, K. Sigrist, M.M. Lu, F. Jiang, H.S. Ip, and M.S. Parmacek. 1998. GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev*. 12:3579-90.
- Mukhopadhyay, M., S. Shtrom, C. Rodriguez-Esteban, L. Chen, T. Tsukui, L. Gomer, D.W. Dorward, A. Glinka, A. Grinberg, S.P. Huang, C. Niehrs, J.C. Izpisua Belmonte, and H. Westphal. 2001. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell*. 1:423-34.
- Murray, P., and D. Edgar. 2001. Regulation of laminin and COUP-TF expression in extraembryonic endodermal cells. *Mech Dev*. 101:213-5.
- Na, J., K. Lykke-Andersen, M.E. Torres Padilla, and M. Zernicka-Goetz. 2007. Dishevelled proteins regulate cell adhesion in mouse blastocyst and serve to monitor changes in Wnt signaling. *Dev Biol*. 302:40-9.
- Nagy, A., M. Gertsenstein, K. Vintersten, and R. Behringer. 2003. Manipulating the mouse embryo. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Third edition.
- Nichols, J., J. Silva, M. Roode, and A. Smith. 2009. Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development*. 136:3215-22.





- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer, and A. Smith. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 95:379-91.
- Niederreither, K., and P. Dolle. 2008. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet*. 9:541-53.
- Niederreither, K., V. Fraulob, J-M. Garnier, P. Chambon, P.Dollé. 2002. Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mechanisms of Development*. 110:165–171
- Niederreither, K., V. Subbarayan, P. Dolle, and P. Chambon. 1999. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet*. 21:444-8.
- Niehrs, C. 2006. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*. 25:7469-81.
- Nishioka, N., K. Inoue, K. Adachi, H. Kiyonari, M. Ota, A. Ralston, N. Yabuta, S. Hirahara, R.O. Stephenson, N. Ogonuki, R. Makita, H. Kurihara, E.M. Morin-Kensicki, H. Nojima, J. Rossant, K. Nakao, H. Niwa, and H. Sasaki. 2009. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell*. 16:398-410.
- Nishioka, N., S. Yamamoto, H. Kiyonari, H. Sato, A. Sawada, M. Ota, K. Nakao, and H. Sasaki. 2008. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev*. 125:270-83.
- Niswander, L., and G.R. Martin. 1992. Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development*. 114:755-68.
- Niwa, H., J. Miyazaki, and A.G. Smith. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 24:372-6.
- Niwa, H., Y. Toyooka, D. Shimosato, D. Strumpf, K. Takahashi, R. Yagi, and J. Rossant. 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*. 123:917-29.
- Ogawa, K., R. Nishinakamura, Y. Iwamatsu, D. Shimosato, and H. Niwa. 2006. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 343:159-66.
- Okamoto, I., A.P. Otte, C.D. Allis, D. Reinberg, and E. Heard. 2004. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*. 303:644-9.



- Okano, M., D.W. Bell, D.A. Haber, and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 99:247-57.
- Okumura-Nakanishi, S., M. Saito, H. Niwa, and F. Ishikawa. 2005. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 280:5307-17.
- Ouji, Y., M. Yoshikawa, A. Shiroy, and S. Ishizaka. 2006. Wnt-10b promotes differentiation of skin epithelial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 342:28-35.
- Palmieri, S.L., W. Peter, H. Hess, and H.R. Scholer. 1994. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol*. 166:259-67.
- Pan, G., and J.A. Thomson. 2007. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res*. 17:42-9.
- Pandolfi, P.P., M.E. Roth, A. Karis, M.W. Leonard, E. Dzierzak, F.G. Grosveld, J.D. Engel, and M.H. Lindenbaum. 1995. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet*. 11:40-4.
- Pares, X., J. Farres, N. Kedishvili, and G. Duester. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 65:3936-49.
- Parrow V., C. Horton, M. Maden, S. Laurie, E. Notarianni. 1998. Retinoids are endogenous to the porcine blastocyst and secreted by trophectoderm cells at functionally-active levels. *Int.J.Dev. Biol*. 42:629-632.
- Peaston, A.E., A.V. Evsikov, J.H. Graber, W.N. de Vries, A.E. Holbrook, D. Solter, and B.B. Knowles. 2004. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell*. 7:597-606.
- Perea-Gomez, A., M. Rhinn, and S.L. Ang. 2001. Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. *Int J Dev Biol*. 45:311-20.
- Perea-Gomez, A., F.D. Vella, W. Shawlot, M. Oulad-Abdelghani, C. Chazaud, C. Meno, V. Pfister, L. Chen, E. Robertson, H. Hamada, R.R. Behringer, and S.L. Ang. 2002. Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Dev Cell*. 3:745-56.
- Pereira, F.A., Y. Qiu, G. Zhou, M.J. Tsai, and S.Y. Tsai. 1999. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev*. 13:1037-49.



- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- Pinson, K.I., J. Brennan, S. Monkley, B.J. Avery, and W.C. Skarnes. 2000. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature.* 407:535-8.
- Piotrowska, K., F. Wianny, R.A. Pedersen, and M. Zernicka-Goetz. 2001. Blastomeres arising from the first cleavage division have distinguishable fates in normal mouse development. *Development.* 128:3739-48.
- Piotrowska-Nitsche, K., A. Perea-Gomez, S. Haraguchi, and M. Zernicka-Goetz. 2005. Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development.* 132:479-90.
- Piotrowska-Nitsche, K., and M. Zernicka-Goetz. 2005. Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mech Dev.* 122:487-500.
- Plusa, B., A. Piliszek, S. Frankenberg, J. Artus, and A.K. Hadjantonakis. 2008. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development.* 135:3081-91.
- Plusa, B., K. Piotrowska, and M. Zernicka-Goetz. 2002. Sperm entry position provides a surface marker for the first cleavage plane of the mouse zygote. *Genesis.* 32:193-8.
- Poirier, F., P.M. Timmons, C.T. Chan, J.L. Guenet, and P.W. Rigby. 1992. Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. *Development.* 115:143-55.
- Qiu, Y., F.A. Pereira, F.J. DeMayo, J.P. Lydon, S.Y. Tsai, and M.J. Tsai. 1997. Null mutation of mCOUP-TFI results in defects in morphogenesis of the glossopharyngeal ganglion, axonal projection, and arborization. *Genes Dev.* 11:1925-37.
- Ralston, A., B.J. Cox, N. Nishioka, H. Sasaki, E. Chea, P. Rugg-Gunn, G. Guo, P. Robson, J.S. Draper, and J. Rossant. 2010. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development.* 137:395-403.
- Ralston, A., and J. Rossant. 2008. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol.* 313:614-29.
- Rappolee, D.A., and Z. Werb. 1990. mRNA phenotyping for studying gene expression in small numbers of cells: platelet-derived growth factor and other growth factors in wound-derived macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2:3-10.



- Ray, S., D. Dutta, M.A. Rumi, L.N. Kent, M.J. Soares, and S. Paul. 2009. Context-dependent function of regulatory elements and a switch in chromatin occupancy between GATA3 and GATA2 regulate Gata2 transcription during trophoblast differentiation. *J Biol Chem.* 284:4978-88.
- Rivera-Perez, J.A., J. Mager, and T. Magnuson. 2003. Dynamic morphogenetic events characterize the mouse visceral endoderm. *Dev Biol.* 261:470-87.
- Rochette-Egly, C. 2003. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal.* 15:355-66.
- Rodda, D.J., J.L. Chew, L.H. Lim, Y.H. Loh, B. Wang, H.H. Ng, and P. Robson. 2005. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem.* 280:24731-7.
- Rodriguez, A., C. Diez, S. Ikeda, L.J. Royo, J.N. Caamano, C. Alonso-Montes, F. Goyache, I. Alvarez, N. Facal, and E. Gomez. 2006. Retinoids during the in vitro transition from bovine morula to blastocyst. *Hum Reprod.* 21:2149-57.
- Rogers, M.B., B.A. Hosler, and L.J. Gudas. 1991. Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development.* 113:815-24.
- Rossant, J., C. Chazaud, and Y. Yamanaka. 2003. Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358:1341-8; discussion 1349.
- Rossant, J., J.P. Sanford, V.M. Chapman, and G.K. Andrews. 1986. Undermethylation of structural gene sequences in extraembryonic lineages of the mouse. *Dev Biol.* 117:567-73.
- Rossant, J., and P.P. Tam. 2009. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development.* 136:701-13.
- Rossant, J., R. Zirngibl, D. Cado, M. Shago, and V. Giguere. 1991. Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5:1333-44.
- Rougier, N., D. Bourc'his, D.M. Gomes, A. Niveleau, M. Plachot, A. Paldi, and E. Viegas-Pequignot. 1998. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev.* 12:2108-13.
- Ruberte, E., P. Dolle, P. Chambon, and G. Morriss-Kay. 1991. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development.* 111:45-60.





- Rula, M.E., K.Q. Cai, R. Moore, D.H. Yang, C.M. Staub, C.D. Capo-Chichi, S.A. Jablonski, P.H. Howe, E.R. Smith, and X.X. Xu. 2007. Cell autonomous sorting and surface positioning in the formation of primitive endoderm in embryoid bodies. *Genesis*. 45:327-38.
- Russ, A.P., S. Wattler, W.H. Colledge, S.A. Aparicio, M.B. Carlton, J.J. Pearce, S.C. Barton, M.A. Surani, K. Ryan, M.C. Nehls, V. Wilson, and M.J. Evans. 2000. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature*. 404:95-9.
- Sandell, L.L., B.W. Sanderson, G. Moiseyev, T. Johnson, A. Mushegian, K. Young, J.P. Rey, J.X. Ma, K. Staehling-Hampton, and P.A. Trainor. 2007. RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev*. 21:1113-24.
- Santos, F., B. Hendrich, W. Reik, and W. Dean. 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*. 241:172-82.
- Sato, H., K. Amagai, R. Shimizukawa, and Y. Tamai. 2009. Stable generation of serum- and feeder-free embryonic stem cell-derived mice with full germline-competency by using a GSK3 specific inhibitor. *Genesis*. 47:414-22.
- Sato, N., L. Meijer, L. Skaltsounis, P. Greengard, and A.H. Brivanlou. 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*. 10:55-63.
- Sessler, R.J., and N. Noy. 2005. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol Cell*. 18:343-53.
- Seto, E.S., and H.J. Bellen. 2004. The ins and outs of Wingless signaling. *Trends Cell Biol*. 14:45-53.
- Shi, L., and J. Wu. 2009. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Reprod Biol Endocrinol*. 7:59.
- Shibamoto S., J. Winer, M. Williams, P. Polakis. A blockade in Wnt signaling is activated following the differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Experimental Cell Research*. 292:11–20
- Shimosato, D., M. Shiki, and H. Niwa. 2007. Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA factors acquire the character of XEN cells. *BMC Dev Biol*. 7:80.



- Silva, J., J. Nichols, T.W. Theunissen, G. Guo, A.L. van Oosten, O. Barrandon, J. Wray, S. Yamanaka, I. Chambers, and A. Smith. 2009. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*. 138:722-37.
- Silvestri, C., M. Narimatsu, I. von Both, Y. Liu, N.B. Tan, L. Izzi, P. McCaffery, J.L. Wrana, and L. Attisano. 2008. Genome-wide identification of Smad/Foxh1 targets reveals a role for Foxh1 in retinoic acid regulation and forebrain development. *Dev Cell*. 14:411-23.
- Simons M., M. Mlodzik. 2008. Planar Cell Polarity Signaling: From Fly Development to Human Disease. *Annu. Rev. Genet.* 42:517-40
- Singla, D.K., D.J. Schneider, M.M. LeWinter, and B.E. Sobel. 2006. wnt3a but not wnt11 supports self-renewal of embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 345:789-95.
- Smith, A.G., J.K. Heath, D.D. Donaldson, G.G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, and D. Rogers. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 336:688-90.
- Sonneveld, E., C.E. van den Brink, L.G. Tertoolen, B. van der Burg, and P.T. van der Saag. 1999. Retinoic acid hydroxylase (CYP26) is a key enzyme in neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Dev Biol*. 213:390-404.
- Soudais, C., M. Bielinska, M. Heikinheimo, C.A. MacArthur, N. Narita, J.E. Saffitz, M.C. Simon, J.M. Leiden, and D.B. Wilson. 1995. Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Development*. 121:3877-88.
- Srinivas, S., T. Rodriguez, M. Clements, J.C. Smith, and R.S. Beddington. 2004. Active cell migration drives the unilateral movements of the anterior visceral endoderm. *Development*. 131:1157-64.
- Stephens, L.E., J.E. Sonne, M.L. Fitzgerald, and C.H. Damsky. 1993. Targeted deletion of beta 1 integrins in F9 embryonal carcinoma cells affects morphological differentiation but not tissue-specific gene expression. *J Cell Biol*. 123:1607-20.
- Stephens, L.E., A.E. Sutherland, I.V. Klimanskaya, A. Andrieux, J. Meneses, R.A. Pedersen, and C.H. Damsky. 1995. Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev*. 9:1883-95.
- Stravidis M.P., B.J. Collins, K.G. Storey. 2010. Retinoic acid orchestrates fibroblast growth factor signalling to drive embryonic stem cell differentiation. *Development*. 137:881-890.



- Strumpf, D., C.A. Mao, Y. Yamanaka, A. Ralston, K. Chawengsaksophak, F. Beck, and J. Rossant. 2005. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*. 132:2093-102.
- Surani, M.A., K. Hayashi, and P. Hajkova. 2007. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*. 128:747-62.
- Suwinska, A., R. Czolowska, W. Ozdzinski, and A.K. Tarkowski. 2008. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev Biol*. 322:133-44.
- Svoboda, P., P. Stein, M. Anger, E. Bernstein, G.J. Hannon, and R.M. Schultz. 2004. RNAi and expression of retrotransposons MuERV-L and IAP in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol*. 269:276-85.
- Tahayato, A., P. Dolle, and M. Petkovich. 2003. Cyp26C1 encodes a novel retinoic acid-metabolizing enzyme expressed in the hindbrain, inner ear, first branchial arch and tooth buds during murine development. *Gene Expr Patterns*. 3:449-54.
- Takada, R., H. Hijikata, H. Kondoh, and S. Takada. 2005. Analysis of combinatorial effects of Wnts and Frizzleds on beta-catenin/armadillo stabilization and Dishevelled phosphorylation. *Genes Cells*. 10:919-28.
- Takahashi-Tezuka, M., Y. Yoshida, T. Fukada, T. Ohtani, Y. Yamanaka, K. Nishida, K. Nakajima, M. Hibi, and T. Hirano. 1998. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*. 18:4109-17.
- Takaoka, K., M. Yamamoto, H. Shiratori, C. Meno, J. Rossant, Y. Saijoh, and H. Hamada. 2006. The mouse embryo autonomously acquires anterior-posterior polarity at implantation. *Dev Cell*. 10:451-9.
- Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:3801-4.
- Tamai, K., X. Zeng, C. Liu, X. Zhang, Y. Harada, Z. Chang, and X. He. 2004. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell*. 13:149-56.
- Tanaka, S., T. Kunath, A.K. Hadjantonakis, A. Nagy, and J. Rossant. 1998. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*. 282:2072-5.
- Tanaka, T.S., T. Kunath, W.L. Kimber, S.A. Jaradat, C.A. Stagg, M. Usuda, T. Yokota, H. Niwa, J. Rossant, and M.S. Ko. 2002. Gene expression profiling of embryo-derived



- stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res.* 12:1921-8.
- Thatcher J.E., N. Isoherranen. 2009. The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 5(8): 875–886.
- Tesar, P.J., J.G. Chenoweth, F.A. Brook, T.J. Davies, E.P. Evans, D.L. Mack, R.L. Gardner, and R.D. McKay. 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature.* 448:196-9.
- Thompson, J.R., and L.J. Gudas. 2002. Retinoic acid induces parietal endoderm but not primitive endoderm and visceral endoderm differentiation in F9 teratocarcinoma stem cells with a targeted deletion of the Rex-1 (Zfp-42) gene. *Mol Cell Endocrinol.* 195:119-33.
- Torres-Padilla, M.E., D.E. Parfitt, T. Kouzarides, and M. Zernicka-Goetz. 2007a. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature.* 445:214-8.
- Torres-Padilla, M.E., L. Richardson, P. Kolasinska, S.M. Meilhac, M.V. Luetke-Eversloh, and M. Zernicka-Goetz. 2007b. The anterior visceral endoderm of the mouse embryo is established from both preimplantation precursor cells and by de novo gene expression after implantation. *Dev Biol.* 309:97-112.
- Uehara, M., K. Yashiro, S. Mamiya, J. Nishino, P. Chambon, P. Dolle, and Y. Sakai. 2007. CYP26A1 and CYP26C1 cooperatively regulate anterior-posterior patterning of the developing brain and the production of migratory cranial neural crest cells in the mouse. *Dev Biol.* 302:399-411.
- Uehara, M., K. Yashiro, K. Takaoka, M. Yamamoto, and H. Hamada. 2009. Removal of maternal retinoic acid by embryonic CYP26 is required for correct Nodal expression during early embryonic patterning. *Genes Dev.* 23:1689-98.
- Ulven, S.M., T.E. Gundersen, M.S. Weedon, V.O. Landaas, A.K. Sakhi, S.H. Fromm, B.A. Geronimo, J.O. Moskaug, and R. Blomhoff. 2000. Identification of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins, and receptors during early postimplantation development in mouse: important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-trans-retinoic acid. *Dev Biol.* 220:379-91.
- van Amerongen, R., and A. Berns. 2006. Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends Genet.* 22:678-89.
- van Amerongen, R., and R. Nusse. 2009. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development.* 136:3205-14.





- Verheijen M.H.G., R.M.F. Wolthuis, J.L. Bos, L.H.K. Defize. 1999. The Ras/Erk Pathway Induces Primitive Endoderm but Prevents Parietal Endoderm Differentiation of F9 Embryonal Carcinoma Cells. *J Biol Chem.* 274:1487–1494.
- Wang, Q.T., K. Piotrowska, M.A. Ciemerych, L. Milenkovic, M.P. Scott, R.W. Davis, and M. Zernicka-Goetz. 2004. A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev Cell.* 6:133-44.
- Wang, S.H., M.S. Tsai, M.F. Chiang, and H. Li. 2003. A novel NK-type homeobox gene, ENK (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells. *Gene Expr Patterns.* 3:99-103.
- Ware, C.B., M.C. Horowitz, B.R. Renshaw, J.S. Hunt, D. Liggitt, S.A. Koblar, B.C. Gliniak, H.J. McKenna, T. Papayannopoulou, B. Thoma, and et al. 1995. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development.* 121:1283-99.
- Watanabe, D., I. Suetake, T. Tada, and S. Tajima. 2002. Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech Dev.* 118:187-90.
- Watson, A.J., D.R. Natale, and L.C. Barcroft. 2004. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci.* 82-83:583-92.
- Wilder, P.J., D. Kelly, K. Brigman, C.L. Peterson, T. Nowling, Q.S. Gao, R.D. McComb, M.R. Capecchi, and A. Rizzino. 1997. Inactivation of the FGF-4 gene in embryonic stem cells alters the growth and/or the survival of their early differentiated progeny. *Dev Biol.* 192:614-29.
- Williams, R.L., D.J. Hilton, S. Pease, T.A. Willson, C.L. Stewart, D.P. Gearing, E.F. Wagner, D. Metcalf, N.A. Nicola, and N.M. Gough. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.* 336:684-7.
- Wobus, A.M., and K.R. Boheler. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev.* 85:635-78.
- Wong, G.T., B.J. Gavin, and A.P. McMahon. 1994. Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol.* 14:6278-86.
- Wu, W., A. Glinka, H. Delius, and C. Niehrs. 2000. Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling. *Curr Biol.* 10:1611-4.
- Xin, M., C.A. Davis, J.D. Molkentin, C.L. Lien, S.A. Duncan, J.A. Richardson, and E.N. Olson. 2006. A threshold of GATA4 and GATA6 expression is required for cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11189-94.



- Xu, R.H., X. Chen, D.S. Li, R. Li, G.C. Addicks, C. Glennon, T.P. Zwaka, and J.A. Thomson. 2002. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol.* 20:1261-4.
- Yagi, R., M.J. Kohn, I. Karavanova, K.J. Kaneko, D. Vullhorst, M.L. DePamphilis, and A. Buonanno. 2007. Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development.* 134:3827-36.
- Yamanaka, Y., F. Lanner, and J. Rossant. 2010. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development.* 137:715-24.
- Yamanaka, Y., A. Ralston, R.O. Stephenson, and J. Rossant. 2006. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn.* 235:2301-14.
- Yang, D.H., K.Q. Cai, I.H. Roland, E.R. Smith, and X.X. Xu. 2007. Disabled-2 is an epithelial surface positioning gene. *J Biol Chem.* 282:13114-22.
- Yang, D.H., E.R. Smith, I.H. Roland, Z. Sheng, J. He, W.D. Martin, T.C. Hamilton, J.D. Lambeth, and X.X. Xu. 2002. Disabled-2 is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis. *Dev Biol.* 251:27-44.
- Yashiro, K., X. Zhao, M. Uehara, K. Yamashita, M. Nishijima, J. Nishino, Y. Saijoh, Y. Sakai, and H. Hamada. 2004. Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Dev Cell.* 6:411-22.
- Ybot-Gonzalez, P., A.J. Copp, and N.D. Greene. 2005. Expression pattern of glypican-4 suggests multiple roles during mouse development. *Dev Dyn.* 233:1013-7.
- Yeom, Y.I., G. Fuhrmann, C.E. Ovitt, A. Brehm, K. Ohbo, M. Gross, K. Hubner, and H.R. Scholer. 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development.* 122:881-94.
- Ying, Q.L., J. Wray, J. Nichols, L. Batlle-Morera, B. Doble, J. Woodgett, P. Cohen, and A. Smith. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* 453:519-23.
- Yoshida, K., I. Chambers, J. Nichols, A. Smith, M. Saito, K. Yasukawa, M. Shoyab, T. Taga, and T. Kishimoto. 1994. Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mech Dev.* 45:163-71.
- Yoshida, K., T. Taga, M. Saito, S. Suematsu, A. Kumanogoh, T. Tanaka, H. Fujiwara, M. Hirata, T. Yamagami, T. Nakahata, T. Hirabayashi, Y. Yoneda, K. Tanaka, W.Z. Wang, C. Mori, K. Shiota, N. Yoshida, and T. Kishimoto. 1996. Targeted disruption



- of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:407-11.
- Yoshida-Koide, U., T. Matsuda, K. Saikawa, Y. Nakanuma, T. Yokota, M. Asashima, and H. Koide. 2004. Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 313:475-81.
- Yu, J., and J.A. Thomson. 2008. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev*. 22:1987-97.
- Zelent, A., A. Krust, M. Petkovich, P. Kastner, and P. Chambon. 1989. Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature*. 339:714-7.
- Zernicka-Goetz, M. 2006. The first cell-fate decisions in the mouse embryo: destiny is a matter of both chance and choice. *Curr Opin Genet Dev*. 16:406-12.
- Zhang, M., P. Hu, C.R. Krois, M.A. Kane, and J.L. Napoli. 2007. Altered vitamin A homeostasis and increased size and adiposity in the rdh1-null mouse. *FASEB J*. 21:2886-96.
- Zhao, D., P. McCaffery, K.J. Ivins, R.L. Neve, P. Hogan, W.W. Chin, and U.C. Drager. 1996. Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur J Biochem*. 240:15-22.







## RESUME

Les études menées depuis de nombreuses années sur l'embryogenèse de la souris ont permis sa caractérisation morphologique. Le but de notre équipe est de participer à l'élucidation des facteurs jouant un rôle important dans le développement préimplantatoire murin. Pour cela, nous nous focalisons sur un des premiers types cellulaires déterminé à ces stades : l'endoderme primitif (EPr). L'EPr est un tissu extra-embryonnaire formant un épithélium indispensable au bon déroulement du développement et à la survie de l'embryon.

Afin de mieux caractériser les facteurs génétiques et voies de signalisations impliquées dans la différenciation de l'EPr chez la souris, je me suis intéressée à la signalisation rétinoïque ainsi qu'à la voie Wnt canonique. J'ai tout d'abord analysé l'expression des marqueurs de l'EPr et de l'épiblaste (le tissu embryonnaire) par RT-PCR quantitative au cours de la différenciation de cellules F9 en cellules de l'EPr par l'acide rétinoïque. Ainsi, j'ai montré que les marqueurs endodermiques sont induits séquentiellement et dans le même ordre que *in vivo*. J'ai également adapté ce protocole aux embryons préimplantatoires. Grâce à l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie j'ai caractérisé les profils d'expression de différents acteurs de la voie des rétinoïdes ainsi que de Dkk1 un inhibiteur spécifique de la voie Wnt canonique.

## ABSTRACT

Numerous studies on the mouse embryo have allowed to characterize the morphological events occurring at early development. Our groups aims to clarify the mechanisms of preimplantation embryogenesis in the mouse, focusing on the differentiation of the primitive endoderm (PrE). The PrE is the second extraembryonic tissue formed before implantation and required for both survival and correct development of the embryo.

In order to get a better understanding of how PrE fate is established and the épithélium formed, I focused my studie on two signaling pathways : retinoic acid signaling and the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. I analysed the expression of PrE and epiblast markers on a RA-driven F9 cell differentiation by quantitative RT-PCR. I show that PrE-genes are sequentially induced and in the same order as observed *in vivo* by immunostaining. I also adapted this protocol for preimplantation embryos. By *in situ* hybridizations and immunostainings I characterized the expression profils of different members of the two signaling pathways.